

**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**

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, GENOTÍPICA DE
Escherichia coli PROVENIENTES DE *Mytella guyanensis* E
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

CARLA ALVES BARBOSA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO - 2017

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, GENOTÍPICA DE
Escherichia coli PROVENIENTES DE *Mytella guyanensis* E
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

CARLA ALVES BARBOSA

Nutricionista

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

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: Isabella de Matos Mendes da Silva

Co-orientador: Paulo José Lima Juiz

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

B238c

Barbosa, Carla Alves.

Caracterização microbiológica, genotípica de *Escherichia coli* provenientes de *Mytella guyanensis* e sensibilidade a antimicrobianos / Carla Alves Barbosa._ Cruz das Almas, BA, 2017.

84f.; il.

Orientadora: Isabella de Matos Mendes da Silva.

Co-orientador: Paulo José Lima Juiz.

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

CDD: 576.163

**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
CARLA ALVES BARBOSA**

Isabella de Matos Mendes da Silva

Dr^a. Isabella de Matos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Orientadora

Hélio Mitoshi Kamida

Dr. Hélio Mitoshi Kamida
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Marcílio Delan Baliza Fernandes

Dr. Marcílio Delan Baliza Fernandes
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

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

A minha família,
em especial minha mãe e meu pai,
por serem meus exemplos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o dono da minha vida, meu protetor e me mostrar sempre a luz no fim do túnel.

A meus pais, Carlos Pereira Barbosa e Nilzete Alves Barbosa, por serem fontes inesgotáveis de amor, paciência e dos melhores ensinamentos para a vida.

Aos meus irmãos, Rodrigo, Tiago, Carlos e Uelinton, por todo o incentivo e apoio durante essa jornada.

As minhas cunhadas, em especial Tatiana Pimentel, por todo o apoio.

Aos meus amigos: Camilla Godinho, Fernanda Alves, Geovanilda Conceição, Calliana Souza, Josiane Rocha, Danilo, Marcos, Neilton, por todo o apoio.

A professora Dr^a. Isabella de Matos Mendes da Silva, por toda a paciência e conhecimento a mim dispensados, pela confiança a mim depositada e por me mostrar que vale viver cada momento da construção de um processo para que o fim seja de sucesso. “Sem a senhora não seria a mesma coisa”.

Ao professor Dr. Paulo José Lima Juiz, por todos os ensinamentos, paciência, confiança e por me auxiliar na construção do saber mais crítico

Ao professor, Ph.D. Fábio de Oliveira, pelos conhecimentos compartilhados na área de química.

A professora Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto, pela ajuda nos testes de suscetibilidade antimicrobiana.

A professora Dr^a. Franceli da Silva pela disponibilização do laboratório para a realização dos testes fitoquímicos.

A Dr^a. Simone Teles, por todos os ensinamentos e ajuda na realização dos testes fitoquímicos.

Ao Dr. Ricardo Mendes, por todas as valiosas dicas para a melhoria do trabalho.

Ao Dr. Marcílio Baliza, pela disponibilização do laboratório para a genotipagem das amostras.

A Dr^a. Ludmilla Santana Soares e Barros, pelo apoio na parte microbiológica.

A equipe do Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por todo o auxílio.

A equipe do Laboratório de Análises de Alimentos e Ambiental (LABMAA) pela ajuda nos testes microbiológicos, em especial, Jéssica Ferreira Mafra, por dispensar horas do seu tempo para me ajudar.

A Felipe Miranda por todo o apoio, ajuda e coleguismo.

A Brenda Borges Vieira por caminhar comigo nessa jornada e me mostrar que amizade é melhor que a competição.

Aos funcionários do Núcleo de Apoio Técnico do Centro de Ciências da Saúde, em especial a Me.Taiana de Araújo Conceição, por toda a paciência e ajuda nos experimentos na área de genética.

A todos os professores do mestrado em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, que de forma direta ou indireta contribuíram com esse processo de formação.

A todos os brasileiros que de alguma forma contribuíram com essa formação, e muitas vezes não tem ou tiveram a oportunidade de adentrar no mundo acadêmico.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1- Perfil de sensibilidade de cepa padrão de EHEC CDC EDL-933 e isolados de *Escherichia coli* provenientes de sururu *Mytella guyanensis* oriundo de mercados e de pontos de venda da feira livre de Cachoeira, Bahia, Brasil. 61

Tabela 2- Triagem fitoquímica para detecção de metabólitos secundários nos extratos vegetais das folhas e casca de *Artocarpus heterophyllus* Lam..... 63

Capítulo 3

Tabela 1- Componentes utilizados para a amplificação dos genes *stx*, *elt* e *bfpA* na Reação em Cadeia da Polimerase..... 75

Tabela 2- Sequência de *primers*, tamanho do fragmento amplificado e condições para a Reação em Cadeia da Polimerase..... 76

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1		
Figura 1 -	Fotografia de <i>Mytella guyanensis</i>	23
Figura 2 -	Fotografia de <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.....	37
Figura 3 -	Fotografia da jaca fruto característico de <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.....	38
Capítulo 2		
Figura 1 -	População de <i>Escherichia coli</i> (log UFC.g ⁻¹) em amostras de <i>Mytella guyanensis</i> provenientes de mercados (A) e pontos de venda da feira livre (B) em Cachoeira entre os meses de dezembro de 2015 e janeiro de 2016.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	<i>Attaching and effacing</i>
AcOEt	Acetato de etila
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BFP	<i>Bundle forming pillus</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo <i>Mueller Hinton</i>
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC	<i>Escherichia enteroagregativa</i>
EAF	<i>EPEC adherence fator</i>
EHEC	<i>Escherichia enterohemorrágica</i>
EBH	Extrato Bruto Hexânico
EBM	Extrato Bruto Metanólico
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FCs	Fatores de colonização
Gb3	Globotriaosilceramida
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
LT	Tóxina Temolábil
MAR	Múltipla resistência a antimicrobianos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Resistência a múltiplas drogas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PDR	Pan-resistência a drogas
RESEX	Reserva Extrativista
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SHU	Síndrome Hemolítico-Urêmica
SPSS	<i>Statistical package for the social sciences</i>
ST	Toxina termoestável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
STX	Toxina Shiga
TACO	Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos
Tir	<i>Translocated Intimin Receptor</i>
UI	Unidades Internacionais
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigênica
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	Resistência extensiva a drogas

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1	
Revisão de Literatura: Estudo da arte sobre contaminação de <i>Mytella guyanensis</i> por <i>Escherichia coli</i> e uso de antimicrobianos para o controle deste microrganismo	20
Resumo	21
Abstract	22
Considerações sobre <i>Mytella guyanensis</i>	23
Contaminação de <i>Mytella guyanensis</i> por bactérias como fator desencadeante para o desenvolvimento de Doenças Transmitidas por Alimentos	24
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	27
<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	28
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica	29
Identificação de cepas de <i>Escherichia coli</i> com a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase	29
Resistência bacteriana: um problema social	30
Extratos vegetais como fonte de compostos ativos	32
Atividade antibacteriana de extratos vegetais.....	34
<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.....	36
REFERÊNCIAS.....	40

CAPÍTULO 2

<i>Escherichia coli</i> em <i>Mytella guyanensis</i> e sensibilidade a antimicrobianos comerciais e extratos de <i>Artocarpus heterophyllus</i>	52
Resumo.....	53
Abstract	54
Introdução	54
Material e métodos	55
Resultados e discussão	59
Conclusão	64
REFERÊNCIAS	64

CAPÍTULO 3

Presença de genes de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes de sururu <i>Mytella guyanensis</i> comercializado.....	70
Resumo	71
Abstract	72
Introdução	73
Material e métodos	74
Resultados	76
Discussão	77
Agradecimentos	78
REFERÊNCIAS	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83

RESUMO

BARBOSA, C.A. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, GENOTÍPICA DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE *Mytella guyanensis* e SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O trabalho teve como objetivo realizar a caracterização microbiológica e genotípica de *Escherichia coli* provenientes de sururu (*Mytella guyanensis*) e testar a sensibilidade a antimicrobianos comerciais e extratos obtidos de folha e casca de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam). Foram realizadas três coletas de sururu entre os meses de dezembro de 2015 e janeiro de 2016, em cada coleta foram adquiridas duas amostras de mercados e duas amostras de pontos de venda da feira livre em Cachoeira, Bahia, Brasil, desta forma foram coletadas 12 amostras no total. Estimou-se a população de *E. coli* utilizando placas EC (AOAC 998.08). O isolamento de cepas de *E. coli* foi realizado utilizando ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e a preservação em glicerol a 15 % e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a -20° C. Realizou-se a extração do DNA dos isolados de *E. coli* e utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisar os genes de virulência *stx*, *bfpA* e *elt*. O perfil de sensibilidade dos isolados a antimicrobianos comerciais foi determinado pelo método disco-difusão. Para a determinação do perfil de sensibilidade a extratos de *A. heterophyllus* foram coletadas folhas e casca do caule desta planta e os extratos foram feitos pela técnica de maceração a frio, utilizando metanol e hexano para os extratos brutos, diclorometano e acetato de etila para as partições do extrato bruto metanólico. Realizou-se a triagem fitoquímica para a detecção da presença de metabólitos secundários nos extratos. O método usado para a determinação da sensibilidade de cepas de *E. coli* aos extratos foi o método de microdiluição em caldo, visando à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Realizou-se a análise estatística descritiva para a obtenção da máxima, mediana e mínima e análise de variância (ANOVA) para a obtenção da diferença entre as médias com as contagens microbiológicas. A contagem de *E. coli* variou entre <1 a 4,0 log UFC.g⁻¹ para as amostras dos mercados e <1 a 4,8 log UFC.g⁻¹ para as amostras

da feira. Houve uma tendência para diferença significativa entre as médias das contagens de *E.coli* ($p=0,055$) para as amostras de mercados e da feira. Foram isoladas 12 cepas de *E. coli* a partir das amostras dos mercados e 12 a partir das amostras da feira. Os genes *stx* e, *bfpA* não foram detectados, porém a presença do gene *elt* foi confirmada em 75 % dos isolados. Foram encontradas cepas resistentes a sulfazotrim, gentamicina e amoxicilina-ácido clavulânico. Detectaram-se os seguintes metabolitos secundários nos extratos: flavonoide, tanino, saponina, esteroide, triterpenoide e alcaloide. Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações testadas (1 a 0,12 mg.mL⁻¹ e 10 a 1,25 mg.mL⁻¹). O consumo de *M. guyanensis* comercializado em mercados e na feira em Cachoeira infere riscos para a saúde dos consumidores pela possível contaminação por microrganismos patogênicos, que podem ter relação com contaminação ambiental ou durante o beneficiamento desses alimentos.

Palavras-chave: Molusco. Bivalve. Sururu. Jaqueira.

ABSTRACT

BARBOSA, C.A. MICROBIOLOGICAL, GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Escherichia coli* FROM *Mytella guyanensis* AND SENSITIVITY TO ANTIMICROBIALS

This work aimed to achieve a microbiological and genotypic characterization of *Escherichia coli* from mussel (*Mytella guyanensis*) and to test its sensitivity to commercial antimicrobials and extracts obtained from leaf and bark of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Three mollusk collections were performed between December 2015 and January 2016. In each collection, two samples from markets and two from free market stands were gathered in Cachoeira, Bahia, Brazil, totalizing 12 samples. *Escherichia coli* populations were estimated by using Petrifilm™ (3M Company) plates (AOAC 998.08). Isolation of *Escherichia coli* strains was performed by using eosin methylene blue agar (EMB) and preserved in 15 % glycerol and brain-heart infusion broth medium (BHI) at -20°C. DNA extraction from *Escherichia coli* isolates was carried out by polymerase chain reaction (PCR), in order to screen for *stx*, *bfpA* and *elt* virulence genes. The isolates' sensitivity profile to commercial antimicrobials was determined by disc diffusion method. In order to determine the sensitivity profile to *A. heterophyllus* extracts, leaves and stem barks from were collected and extracts were made by cold maceration, using methanol and hexane for crude extracts and dichloromethane and ethyl acetate for partitions of the crude methanolic extract. Phytochemical screening was performed to detect the presence of secondary metabolites in extracts. In order to evaluate the sensitivity of *E. coli* strains to extracts, broth microdilution method was used, aiming to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Descriptive statistical analysis was performed to obtain maximum, median, minimum and analysis of variance (ANOVA) values, so that the difference between means and the microbiological counts could be determined. *E. coli* counts ranged from <1 to 4.0 log CFU.g⁻¹ for market samples and <1 to 4.8 log CFU.g⁻¹ for free market samples. There was a trend for a significant difference between the means of *E. coli* counts ($p = 0.055$)

for market and fair samples. Twelve *E. coli* strains were isolated from market samples and twelve from free market samples. *stx* and *bfpA* genes were not detected, but the presence of *elt* gene was confirmed in 75 % of isolates. Trimethoprim/sulfamethoxazole, gentamicin and amoxicillin-clavulanic acid resistant strains were found. The following secondary metabolites were detected in the extracts: flavonoid, tannin, saponin, steroid, triterpenoid and alkaloid. The extracts showed no antimicrobial activity at any of the concentrations tested (1 to 0.12 mg.mL⁻¹ and 10 to 1.25 mg.mL⁻¹). Consumption of *M. guyanensis* from markets and free markets at Cachoeira poses risks to consumers' health due to possible contamination by pathogenic microorganisms that can be related to processing or environmental contamination.

Keywords: Mollusc. Bivalve. Mussel. Jackfruit.

INTRODUÇÃO

O consumo de moluscos bivalves, como *Mytella guyanensis*, crus ou levemente coccionados é realizado com frequência em áreas do litoral do Brasil, onde existem condições favoráveis ao desenvolvimento desses moluscos. Por serem animais filtradores, estes moluscos são capazes de reter impurezas presentes na água e a contaminação pode aumentar caso o beneficiamento desse pescado para comercialização e consumo seja realizado de forma inadequada, o que pode acarretar no surgimento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (PEREIRA et al., 2007; FREITAS et al., 2015).

Entre os anos de 2007 e 2016 foram registrados 6.848 surtos de DTA no Brasil, oriundos do consumo de água e ou alimentos contaminados. Destaca-se que os agentes bacterianos são os maiores causadores desses tipos de doenças e a bactéria *Escherichia coli* se constitui no agente etiológico com mais envolvimento (BRASIL, 2010; BRASIL, 2016).

E. coli é uma bactéria gram-negativa em forma de bacilo, anaeróbia facultativa e pertencente à família Enterobacteriaceae. Esse microrganismo geralmente é um comensal no intestino humano, no entanto algumas cepas de *E.coli* adquiriram fatores de virulência que as tornaram patogênicas, sendo que seis dessas indicadas como diarreogênicas: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (TCHAPTCHET; HANSEN, 2011; FARROKH et al., 2012).

Desta forma é fundamental evitar a multiplicação dessas bactérias em alimentos, como pescado, especialmente moluscos bivalves. Para Costa (2013) algumas medidas devem ser adotadas, incluindo manutenção da qualidade microbiológica da água do local de captura, cuidados após a coleta, manutenção da higiene adequada no processamento, para que o pescado não seja um veículo de *E. coli*. A autora também recomenda o consumo do pescado coccionado adequadamente.

Além de estar envolvida em casos de DTA, estudos como o de Machado et al. (2015) tem mostrado a resistência de *E. coli* a antimicrobianos como ampicilina, amoxicicilina, penicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, moxifloxacina, cefalotina, ceftazidima, estreptomina, cloranfenicol, nitrofurantoína e sulfametoxazol-trimetropim. A resistência bacteriana a antimicrobianos é um problema mundial de saúde e interfere no tratamento de doenças causadas por bactérias (WHO, 2014). Diante do exposto a presença de cepas de *E. coli* em moluscos bivalves representa riscos para a saúde do consumidor (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2014).

Tendo em vista que a disseminação de microrganismos resistentes é uma grande ameaça para o tratamento de doenças microbianas (SAVOIA, 2012), a pesquisa de novos antimicrobianos é necessária para o enfrentamento dessa situação. Neste sentido compostos naturais extraídos de plantas podem ser promissores, visto que a literatura relata importante potencial bioativo destes compostos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Metabólitos secundários produzidos por plantas desempenham atividades contra vírus, fungos e bactérias. O estragão, por exemplo, possui ácido caféico que é eficaz contra vírus, fungos e bactérias (OMOJATE et al., 2014). Outra espécie conhecida pelo seu potencial antimicrobiano é *A. heterophyllum*, conhecida popularmente por jaqueira. De acordo com Elevitch e Manner (2006) é uma planta nativa da Índia e distribuída no Brasil, sendo encontrada em todas as regiões da Bahia (ROMAIUC NETO et al., 2015).

Estudos têm demonstrado o potencial antimicrobiano de extratos de *A. heterophyllum*. Manuel et al. (2012) observaram a atividade antimicrobiana de extratos de acetona feitos a partir do fruto de *A. heterophyllum* em uma concentração de 0,375 mg.mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus*. Sharma, Gupta e Verma (2013) evidenciaram a atividade antimicrobiana de extratos da casca de *A. heterophyllum* frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*, a concentração variou entre 4,2 e 5,9 mg.mL⁻¹. Essa planta possui compostos químicos que podem estar relacionados a

esse potencial, incluindo alcaloides, flavonoides, tanino, saponina, terpenos e esteroides (CAVALCANTE et al., 2013).

Nessa perspectiva, o trabalho foi dividido em três capítulos; no primeiro capítulo consta a revisão de literatura que o embasa teoricamente; no segundo capítulo consta a parte de caracterização microbiológica de *E. coli* provenientes de *M. guyanensis* e sensibilidade a antimicrobianos comerciais e extratos de *A. heterophyllus*; no terceiro capítulo consta a caracterização genotípica dos mesmos isolados de *E. coli*.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura: Estudo da arte sobre contaminação de *Mytella guyanensis* por *Escherichia coli* e uso de antimicrobianos para o controle deste microrganismo

RESUMO

Mytella guyanensis é um molusco bivalve que tem importância comercial na Bahia, sendo fonte de subsistência para muitas famílias ribeirinhas. Esse é retirado dos mangues e passa por um beneficiamento artesanal para ser comercializado. O beneficiamento artesanal nem sempre é realizado em condições higiênico- sanitárias satisfatórias, o que predispõe a uma contaminação do alimento e risco de desenvolvimento de DTA pelos consumidores, uma vez que os moluscos geralmente são consumidos crus ou mal cozidos. Os agentes etiológicos atualmente mais envolvidos em surtos de DTA são as bactérias, dentre estas se destaca *E. coli*, o microrganismo que mais causa DTA no Brasil. Além de acarretar DTA, *E. coli* pode apresentar resistência a antimicrobianos. Tendo em vista que a resistência bacteriana é um problema de saúde pública, estão sendo desenvolvidas novas estratégias para enfrentá-la, como a utilização de extratos de plantas com potencial antimicrobiano, os quais possuem metabólitos secundários que estão relacionados a essa atividade. O Brasil é um país que possui uma grande diversidade de plantas, dentre estas *A. heterophyllus*, que tem sido descrita por apresentar atividade antibacteriana. O uso de extratos de *A. heterophyllus* frente a bactérias é uma alternativa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos que possam ter uma ação contra patógenos de importância clínica, que por vezes apresentam resistência aos antimicrobianos convencionais.

Palavras-chave: Jaqueira. Sururu. Molusco bivalve. Doenças Transmitidas por Alimentos.

ABSTRACT

Mytella guyanensis is a bivalve mollusc with commercial relevance in Bahia, being a source of subsistence for many riverside families. In order to be commercialized, they are taken from mangroves and undergo through artisanal processing. However, artisanal processing is not always performed under satisfactory hygienic and sanitary conditions, generating a risk of food contamination and foodborne diseases, since molluscs are often eaten raw or undercooked. Currently, most etiological agents related to foodborne diseases outbreaks are bacteria and, amongst all bacteria, *Escherichia coli* stands out as the microorganism that causes most foodborne illness in Brazil. In addition to causing foodborne diseases, *E. coli* may be resistant to antimicrobials. Considering that bacterial resistance is a public health problem, new strategies are being developed to address it, such as the use of extracts of plants with antimicrobial potential which have secondary metabolites that are related to this activity. Brazil is a country with a great variety of plants, such as *Artocarpus heterophyllus* Lam., which has been described for its antibacterial activity. The use of *A. heterophyllus* extracts against bacteria is an alternative for the development of new antimicrobials that may have an action against clinically relevant pathogens, which sometimes present resistance to conventional antimicrobials.

Keywords: Jackfruit. Mussel. Bivalve mollusc. Foodborne diseases.

CONSIDERAÇÕES SOBRE *Mytella guyanensis*

A produção pesqueira no Brasil alcançou 1,4 milhões de toneladas em 2011, um incremento de 13,2 % em relação ao ano anterior. Neste mesmo ano 31,7 % do pescado nacional foi produzido no Nordeste e a Bahia foi o segundo estado dessa região com a maior produção. Dentro dessa produção 3 % foram representados pelos moluscos bivalves (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

O aumento da produção de pescado influenciou no aumento do consumo desse alimento com uma elevação de 5,02 Kg/hab de 1999 para 2011. Esse panorama demonstra a busca dos brasileiros por uma alimentação mais saudável, tendo em vista as políticas públicas relacionadas a esse tema (SEBRAE, 2015).

Uma importante atividade pesqueira na Bahia é a extração de moluscos bivalves. Moluscos bivalves são animais invertebrados aquáticos filtradores, que possuem concha carbonatada formada por duas valvas; as ostras, berbigões, mexilhões e vieras são exemplos de moluscos bivalves (MAPA, 2012). Dentre os moluscos bivalves com importância comercial no Brasil está o sururu da espécie *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) que tem ampla distribuição, pois é encontrado em todo o litoral (PEREIRA et al., 2003).

M. guyanensis (figura 1) pertence ao reino: Animalia; filo: Mollusca; classe: Bivalvia; subclasse: Pterimorphia; superordem: Mytilida; ordem: Mytiloidea; superfamília: Mytiloidea; família: Mytilidae; gênero: *Mytella* e espécie: *Mytella guyanensis* (BOUCHET; SARTORI; ROSENBERG, 2016).

Figura 1 – Fotografia de *Mytella guyanensis*



Fonte: Acervo do projeto

Os moluscos bivalves podem ser extraídos dos manguezais por meio da mariscagem, sendo esta uma das atividades que garante a subsistência de muitas famílias no entorno dos manguezais, além de auxiliar na preservação da cultura alimentar, esse é um alimento bastante consumido pelo elevado valor nutricional, apresentando proteína, minerais e ácidos graxos insaturados (CAMILO et al., 2016; MARTINS; SOUTO, 2006; SOUZA et al., 2013).

Na Bahia, uma importante área de extração de bivalves é a Reserva Extrativista (RESEX) Marinha da Baía do Iguape, e um dos moluscos mais extraídos é *M. guyanensis*, que após ser capturado passa por um processo de beneficiamento artesanal. O processo de beneficiamento desse molusco inclui as etapas de pré-cozimento, desconchamento, acondicionamento em sacos plásticos e armazenamento para posterior consumo ou venda (BRASIL, 2000; CAMILO et al., 2016; PENA; FREITAS; CARDIM, 2011).

Existe uma preocupação com a etapa de beneficiamento dos moluscos bivalves, pois nem sempre é realizada em condições satisfatórias de higiene e com técnicas padronizadas que garantam a qualidade do alimento, podendo trazer riscos para a saúde do consumidor (NOBREGA et al., 2014).

Contaminação de *Mytella guyanensis* por bactérias como fator desencadeante para o desenvolvimento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

De acordo com Pinto e Boehs (2008), *M. guyanensis* habita regiões entremarés nos manguezais. Esse organismo se alimenta de fitoplâncton e partículas em suspensão presentes na água por meio da filtração branquial, desta forma podem ser contaminados pela retenção de poluentes e microrganismos (FREITAS et al., 2015; PEREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007). A contaminação desses moluscos também pode ser decorrente de falhas durante a manipulação e armazenamento (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2012). A ingestão desses moluscos contaminados representa riscos para a saúde dos consumidores (OLIVEIRA et al., 2011).

Evangelista-Barreto et al. (2014) avaliaram a qualidade bacteriológica dos bivalves *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *M. guyanensis*

provenientes da Baía do Iguape, Maragogipe, Bahia. Os autores concluíram que os moluscos bivalves comercializados na região do estudo representam riscos para a saúde dos consumidores, por apresentar uma elevada carga microbiana do grupo coliforme e presença de *Salmonella* spp.

Freitas et al. (2015) realizaram avaliação da qualidade sanitária de *M. guyanensis* beneficiado em comunidades quilombolas, sendo que a avaliação foi realizada com o sururu desconchado pelas marisqueiras e o sururu desconchado no laboratório em condições assépticas. Um percentual de 33,33 % das amostras obtidas já desconchadas apresentaram contaminação elevada por *Staphylococcus aureus* (acima de 10^3 UFC.g⁻¹) e 100 % das amostras apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos para *E. coli* ($<2,3 \times 10^2$ UFC/100g), já as amostras obtidas com concha e desconchada no laboratório, em conformidade com as boas práticas de higiene, estavam de acordo com os valores recomendados pela legislação.

O consumo desses alimentos contaminados representa risco de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), doenças causadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados por microrganismos, toxinas microbianas ou substâncias químicas em quantidades suficientes para afetar a saúde do consumidor e que são classificadas como infecção, toxinfecção, intoxicação e intoxicação não bacteriana (BRASIL, 2010; BRASIL, 2016).

Essa classificação das infecções depende da forma como a infecção será causada, sendo a infecção alimentar provocada pela ingestão de microrganismos tais como as bactérias, que possuem a capacidade de invadir tecidos. A toxinfecção causada por toxinas liberadas pelos microrganismos quando já estão no trato gastrointestinal, à intoxicação alimentar provocada pela ingestão de toxinas microbianas pré-formadas no alimento e a intoxicação não bacteriana causada por um metal tóxico, agrotóxico, toxina fúngica ou planta venenosa (BRASIL, 2010).

As DTA são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, milhões de pessoas ficam doentes todos os anos e muitos morrem como resultado do consumo de alimentos contaminados por algum agente infeccioso ou contaminante. Cerca de 600 milhões de casos dessas doenças são registrados a cada ano e os agentes infecciosos são responsáveis pela maior parte desses casos (550 milhões). Esses agentes causaram aproximadamente 23.000 das

420.000 mortes, com destaque para *Salmonella enterica* para 59.000, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) para 37.000, Norovírus para 35.000 e *E.coli* enterotoxigenica (ETEC) para 26.000 mortes (WHO, 2015).

Em estudo realizado por Zhang et al. (2016) foi detectada a presença de alguns dos patógenos que estão envolvidos em casos de DTA, como *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Vibrio parahaemolyticus*, a partir de amostras de carne defumada, salsicha, carne salgada, camarão, sashimi e marisco adquiridos em supermercados chineses entre os anos de 2010 a 2013. De acordo com os autores, amostras provenientes de mercados que não possuem uma temperatura controlada estão mais suscetíveis a contaminação e o fato de detectar bactérias em alimentos já coccionados indica o tratamento térmico inadequado, contaminação pós-processamento ou contaminação cruzada.

No Brasil os agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA entre os anos de 2007 e 2017 foram às bactérias com uma proporção de 95,9 %, sendo *E. coli* a bactéria mais identificada, o que indica que atualmente esse é o microrganismo mais envolvido em surtos de DTA no país (BRASIL, 2017).

As DTA de origem bacteriana são amplamente difundidas e refletem na saúde e economia. Diante desse panorama, existe uma grande preocupação e esforços têm sido destinados ao estudo das DTA e seus agentes causadores, principalmente *E. coli* (ADDIS; SISAY, 2015; NEWELL et al., 2010).

Barbosa et al. (2016) isolaram *E. coli* patogênica a partir de amostras de camarão refrigerado vendidos em mercados de São Paulo. Para os autores, os resultados indicam condições insatisfatórias de higiene por parte dos manipuladores, tais como utilização da mesma luva para outras atividades além da manipulação dos alimentos, tocar partes do corpo sem lavagem posterior das mãos, fumar dentro do local de venda, armazenamento de camarões limpos e inteiros no mesmo local, pesagem dos camarões e de outros alimentos sem realizar a limpeza entre um alimento e outro e utilização de toalhas de pano.

Dentre as bactérias que assumem importante papel na contaminação de alimentos, aquelas da família Enterobacteriaceae merecem destaque. A família Enterobacteriaceae engloba vários gêneros e espécies bacterianas com características comuns, podendo ser destacado o grupo dos coliformes totais

formado pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiela* (TEVA et al., 2009).

Os coliformes totais são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e não formam esporos, conseguem fermentar a lactose com formação de ácido e gás a uma temperatura de 35° C, em um período de 24 h (MADIGAN et al., 2016). Dentro do grupo dos coliformes totais existem os coliformes termotolerantes. Estes continuam fermentando a lactose com produção de gás a uma temperatura de 44 a 45,5 °C e o principal microrganismo desse grupo é *E. coli*, associada diretamente a contaminação fecal por ser predominante no trato intestinal de animais de sangue quente (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA-JÚNIOR et al., 2015).

Este microrganismo faz parte da microbiota do intestino onde são inofensivos, porém alguns são patogênicos, por possuir a capacidade de causar doenças como diarreia ou doenças extraintestinais. Existem seis tipos de *E. coli* que podem causar diarreia, divididos em patótipos de acordo com seus fatores de virulência, são eles: *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), EPEC, ETEC, *E.coli* enteroagregativa (EAEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E.coli* de aderência difusa (DAEC) (CDC, 2015).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

É conhecida também por *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), e verotoxigênica (VTEC). Esse patógeno é associado a casos de diarreia, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica, sendo o sorotipo O157:H7 o mais associado a doenças em humanos (KARMALLI; GANNON; SARGEANT, 2010).

A virulência de EHEC está relacionada principalmente à sua toxina Shiga, porém existem outros fatores de virulência expressados por esse microrganismo (FREITAS FILHO et al., 2014; JOHNSON; NOLAN, 2009; YOON, HOVDE, 2008). A toxina produzida por *E. coli* O157 pode ser de dois tipos Stx1, parecida com a toxina do tipo 1 de *Shigella dysenteriae* e Stx2 que possui homologia de 55-60 % em relação a sequência genética. Essa toxina é altamente nociva para as células humanas, pois se liga ao globotriaosilceramida (Gb3), um receptor da superfície celular, é internalizada por endocitose e se liga na porção 28S do rRNA, inibindo a síntese protéica (PENNINGTON, 2010).

EHEC também pode causar a lesão *attaching and effacing* (A/E), para isso a bactéria se liga a superfície da célula por meio de fatores de adesão, posteriormente transloca proteínas efetoras intracelularmente, que garantem a continuação da ligação íntima entre a célula bacteriana e a célula do hospedeiro, causando desarranjos intracelulares e a lesão A/E na superfície celular (HARTLAND; LEONG, 2013; WONG et al., 2011).

A patogênese de EHEC também é definida por genes codificados em plasmídeos. O plasmídeo pO157 codifica genes que influenciam na adesão bacteriana a células eucarióticas (LIM; YOON; HOVDE, 2010).

Para Paula, Casarin e Tondo (2014) prevenir é essencial para evitar a contaminação dos alimentos e consequente doença nos seres humanos. Nessa perspectiva descrevem a adoção de medidas como pasteurização do leite, cloração da água de abastecimento, higienização dos vegetais que devem ser consumidos crus e cozimento adequado dos alimentos.

***Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

EPEC é um patótipo emergente e subdividido em EPEC típica e atípica, sendo o segundo tipo o mais prevalente e mais importante em surtos de diarreia endêmica em crianças (OCHOA; CONTRERAS, 2011). EPEC típica é considerado um importante patógeno por seus fatores de virulência e ligação com doença grave que pode ser letal (HU; TORRES, 2015). As cepas típicas são aquelas que apresentam o genótipo A/E e o plasmídeo EPEC *adherence factor* (EAF) e as estirpes atípicas não possuem o plasmídeo EAF (GHOSH; ALI, 2010; SOUZA et al., 2016; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Desta forma, EPEC causa a lesão A/E, na qual ocorre a destruição das microvilosidades da borda em escova e utiliza um sistema para translocar proteínas bacterianas efetoras na célula eucariótica hospedeira, com objetivo de subversão dos processos desta mesma célula. Chama-se sistema de secreção T3SS, um importante contribuinte da virulência por propiciar as interações entre a íntima bacteriana e o *translocated intimin receptor* (Tir). Os efetores que são translocados nas células pelo T3SS promovem rearranjos no citoesqueleto da célula hospedeira, modulação imunológica e também contribuem para a diarreia

(CLEMENTS et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2009; GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005).

***Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**

ETEC causa diarreia em lactentes, crianças e adultos que vivem em áreas com saneamento básico precário em países em desenvolvimento, também pode causar a diarreia dos viajantes em pessoas que visitam tais países (CDC, 2014; ISERI et al., 2011).

Os principais fatores de virulência de ETEC são as proteínas extracelulares que afetam as células epiteliais do intestino, a toxina termolábil (LT), a toxina termoestável (ST) e os fatores de colonização (FCs) que são essenciais para a adesão das bactérias à mucosa do intestino (OLANIRAN; NAICKER; PILLAY, 2011; TURNER et al., 2006).

ETEC invade e se liga ao epitélio do intestino delgado por meio dos fatores de colonização, em seguida libera as enterotoxinas (ROUSSEL et al., 2017). As enterotoxinas se ligam a receptores específicos na superfície celular, são endocitadas e causam desarranjos intracelulares, como elevação de mensageiros adenosina monofostao cíclico (AMPc), guanosina monofostato cíclico (GMPc) que levarão uma série de reações e resultado será a secreção de água e eletrólitos para a luz intestinal, levando a diarreia (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RIVERA et al., 2013).

Identificação de cepas de *Escherichia coli* com a utilização da Reação em Cadeia Polimerase

A identificação de diferentes patótipos de *E.coli* pode ser realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Constitui-se em uma técnica bastante utilizada para a detecção de patógenos, pois permite a amplificação de um segmento específico de DNA usando *primers* específicos, produzindo milhões de cópias do fragmento que será posteriormente identificado por técnicas baseadas no tamanho do peso molecular e na carga do DNA. Durante a PCR ocorre a etapa de desnaturação que permite a separação das fitas de DNA, anelamento que permite a ligação dos iniciadores nos locais específicos e extensão da do DNA

pela enzima DNA polimerase utilizando nucleotídeos. A visualização dos produtos da PCR pode ser realizada pela coloração do produto do DNA amplificado com um corante químico ou marcação dos iniciadores de PCR ou nucleotídeos com corantes fluorescentes antes da amplificação. Para a visualização dos produtos da PCR o método mais utilizado é a eletroforese em gel de agarose que separa os produtos com base no tamanho e carga (GARIBYAN; AVASHIA, 2013).

A técnica de PCR é sensível, específica e permite o processamento de um grande número de amostras, nessa perspectiva a sua utilização na detecção de bactérias que podem causar DTA é vantajosa (ROJAS-HERREIRA; GONZÁLEZ-FLORES, 2006), e auxilia na garantia de um alimento seguro para a população (WENNING et al., 2014). Além de provocar doenças em seres humanos, cepas patogênicas de *E.coli* tem apresentado resistência a antimicrobianos, sendo este um problema mundial de saúde (HEIDARY; MOMTAZ; MADANI, 2014).

RESISTÊNCIA BACTERIANA: um problema social

Os antimicrobianos são utilizados em infecções causadas por microrganismos e são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. São exemplos desses medicamentos os β -lactâmicos que inibem a síntese da parede celular (ROMERO et al., 2011). Os inibidores da síntese protéica por sua vez, relacionam-se com os ribossomos, podendo interromper a tradução e a transcrição, como o cloranfenicol e a rifampina. Os que têm ação como antimetabólitos bloqueiam a síntese de ácido fólico, como as sulfonamidas. Antimicrobianos como quinolonas agem na DNA-girase, já alguns antimicrobianos, como actinomicina, ligam-se aos pares de bases do DNA, e, desta forma, inibem a síntese do RNA (MADIGAN et al., 2016).

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um problema mundial de saúde e ameaça o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (WHO, 2014). De acordo com Crofts, Gasparini e Dantas (2017) o ambiente serve como um reservatório para a diversidade de genes de resistência.

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida (BLAIR et al., 2015). A resistência intrínseca está ligada a genes presentes nos genomas bacterianos que podem gerar fenótipos de resistência e ocorre na bactéria de

forma natural (COX; WRIGHT, 2013; DAVIES; DAVIES, 2010). A resistência adquirida, por sua vez, pode ocorrer por mutação ou transferência horizontal de genes (HERNANDO-AMADO et al., 2016). A mutação vai favorecer a eliminação de cepas sensíveis e sobrevivência de cepas resistentes, sem a aquisição de material genético por transferência. A transferência horizontal de genes ocorre com a aquisição de DNA que codifica determinantes de resistência e pode ocorrer por transformação, transdução e conjugação (MUNITA; ARIAS, 2016). Esses genes de resistência podem ser disseminados rapidamente entre as bactérias (RASHEED et al., 2014).

Os mecanismos comuns de resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos são: redução da permeabilidade pela diminuição ou alteração dos canais de penetração de substâncias na célula bacteriana, as porinas (KUMAR; SCHWEIER, 2005; REYGAERT, 2016); utilização das bombas de efluxo para transportar as substâncias para o meio extracelular (BAMBEKE; BALZI; TULKENS, 2000; BLAIR; PIDDOCK, 2016; WEBBER; PIDDOCK, 2003); modificações nos sítios de ligação (NABU et al., 2015; ZAPUN; CONTRERAS-MARTEL; VERNET, 2008), modificação ou degradação por enzimas (BONNET, 2004; SHAIKH et al., 2015); inativação por actilação, adenilação ou fosforilação (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; REYGAERT, 2016) e redução (SHAIKH et al., 2015).

Uma grande preocupação das autoridades de saúde no cenário da resistência são as infecções causadas por bactérias multirresistentes. Na última década as bactérias patogênicas que apresentam múltipla resistência a agentes antimicrobianos aumentaram significativamente e a propagação dessa resistência está relacionada à exposição aos fármacos que proporciona a pressão seletiva necessária (ROCA et al., 2015).

De acordo com Basak, Singh e Rajurkar (2016) uma cepa é resistente a múltiplas drogas (MDR) quando é suscetível a um agente antimicrobiano em três ou mais categorias. Para esses autores existem outras duas denominações relacionadas à múltipla resistência, a resistência extensiva a drogas (XDR), definida como a resistência de uma cepa a quase todas as categorias de antimicrobianos, e Pan resistência (PDR) que é a cepa resistente a todas as categorias de antimicrobianos.

Estudos têm demonstrado a resistência de *E. coli* a antimicrobianos. Machado et al. (2015) isolaram setenta estirpes de *E. coli* a partir de doze amostras de peixes comercializados em Fortaleza e realizaram o teste de suscetibilidade com 20 antimicrobianos. Os autores perceberam que 100 % das cepas testadas tiveram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Para Paurmand et al. (2017) dentre as estratégias para combater o problema da resistência aos antimicrobianos podem ser citadas: a prescrição racional, expansão e implementação de programas de administração antibiótica. De acordo com Bush et al. (2014) outras estratégias também podem ser utilizadas para o combate desse problema, como: educação pública sobre a resistência, condições adequadas de saneamento e maior vigilância da prescrição dos antibióticos, reavaliação de medicamentos que já são usados na prática, erradicação do uso indevido dos medicamentos e fornecimento de novas classes de antimicrobianos. Uma alternativa para a descoberta de novos antimicrobianos é a pesquisa com plantas como fontes de compostos ativos (AHMAD; WAJID, 2013).

EXTRATOS VEGETAIS COMO FONTES DE COMPOSTOS ATIVOS

A utilização de plantas para tratar doenças é uma antiga prática e originou pesquisas para a extração de compostos ativos destes vegetais (SILVEIRA et al., 2011). Tais compostos derivam do metabolismo secundário das plantas, como forma principal de proteção contra agressões externas, são sintetizados de forma restrita e se apresentam em quantidades diferentes a depender da espécie (GARCIA; CARRIL, 2009), podendo ser sintetizados e guardados em todas ou partes específicas das plantas (OMOJATE et al., 2014).

Os metabólitos secundários desempenham funções de defesa nas plantas e também agem nas interações da planta com o ambiente. Além dessas funções, algumas características os definem, tais como não possuem interação direta com o crescimento da planta, geralmente são sintetizados a partir de metabólitos primários, possuem distribuição diferenciada nas plantas, podem ser tóxicos e também podem apresentar forte efeito biológico em outros organismos (FIGUEREDO et al., 2008). As principais famílias de metabólitos secundários são

alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (FUMAGALI et al., 2008; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Os alcaloides são um grupo diverso, possuem nitrogênio e são derivados principalmente dos aminoácidos. Esses metabólitos secundários podem ser encontrados em aproximadamente 20 % das espécies de plantas, desempenham papel de defesa contra herbívoros e patógenos. Pela sua potente atividade biológica, muitos destes compostos tem sido explorados como fármacos (HUANG et al., 2016; ZIEGLER; FACCHINI, 2008). Os terpenoides são derivados de unidades de isoprenos e classificados de acordo com o número desses compostos (MOSES et al., 2013). De acordo com Omojate et al. (2014) os terpenos possuem atividade contra patógenos como bactérias, vírus e fungos.

Os compostos fenólicos são aqueles que possuem um ou mais anéis aromáticos e grupos hidroxila. Esses são os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas, e apresentam-se como moléculas individuais ou polimerizadas. Nas plantas esses compostos estão envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta (UV) ou ataque por patógenos, parasitos e predadores, também são pigmentos que dão cor e estão presentes em todos os órgãos das plantas (DAI; MUMPER, 2010).

O metabolismo secundário das plantas pode sofrer influência de fatores abióticos e bióticos que são determinantes para a quantidade de metabólitos secundários produzidos. Os fatores abióticos estão relacionados a efeitos físicos como intensidade de luz, disponibilidade hídrica, temperatura, condições de solo, radiação UV e os fatores bióticos a fatores fisiológicos das plantas ou interações dessas com microrganismos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PAVARINI et al., 2012).

Para Radusiene, Karpavisiene e Stanius (2012), dentre os fatores que podem influenciar nos compostos químicos das plantas é difícil definir os fatores que causam modificações em compostos específicos. Os autores avaliaram a temperatura e intensidade de luz junto com fases de desenvolvimento da planta no acúmulo de compostos bioativos em *Hypericum perforatum* L. (erva-de-são joão) e os resultados revelaram que a alta temperatura e intensidade de luz têm influência positiva no acúmulo de compostos fenólicos na planta estudada.

Gouvea et al. (2012) estudaram a interferência da sazonalidade no conteúdo de metabólitos secundários de *Eremanthus mattogrossensis* Less

(veludo do cerrado) e evidenciaram que na estação seca (novembro, dezembro, janeiro e fevereiro) as quantidades dos compostos foram menores que na estação chuvosa (maio, junho, julho e agosto), pois nesta estação a planta apresentou maiores concentrações de todas as classes de metabólitos secundários.

Zhang e Bjorn (2009) concluíram que radiação UV tem relação positiva com o aumento das substâncias ativas presentes nas plantas. Para os autores existem explicações diferentes para o estímulo da biossíntese de alguns metabólitos secundários pela radiação UV e essa pode ser uma resposta ao estresse causado pela exposição, os metabólitos secundários podem proteger as plantas da radiação, ou a radiação pode auxiliar na produção dos metabólitos secundários.

Fatores bióticos, como danos as plantas causados por herbívoros e patógenos, podem levar a modificações nas plantas e conseqüentemente alterar a dinâmica das vias de produção dos metabólitos secundários (OLIVOTO et al., 2017). De acordo com Ogbemudia e Thompson (2014) os metabólitos secundários têm desempenhado papel fundamental na adaptação das plantas ao ambiente, incluindo as mudanças ambientais, diminuição das chances de herbivoria, ação de patógenos e capacidade de resistir a situações de estresse.

Barbieri et al. (2017) inferem que os extratos de plantas são uma possível fonte para o desenvolvimento de novas drogas, pois estas produzem metabólitos secundários para defesa contra patógenos e muitos destes apresentam atividade antimicrobiana.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos de plantas podem apresentar atividade antibacteriana em patógenos sensíveis e resistentes a antimicrobianos comerciais, sobretudo pela presença de fitoquímicos (FRIEDMAN, 2015). Estudos como o de Bona et al. (2013) tem demonstrado essa atividade. Os autores realizaram a pesquisa em Cascavel (Paraná) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos aquosos de *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (crisântemo); *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim); *Allium sativum* L. (alho); *Plectranthus barbatus* Andr. (boldo); *Ruta graveolens* L. (arruda); *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (capim limão); *Allium cepa* L. (cebola); *Curcuma longa* L. (curcuma) e *Zingiber officinale* Rosc

(gengibre) frente aos sorovares de *Salmonella* spp., comumente isolados de aviários no Brasil, por meio da metodologia de microdiluição. Os autores evidenciaram que o extrato de alho apresentou o melhor resultado em relação à atividade antimicrobiana, pois os 14 sorovares de *Salmonella* spp. testados apresentaram sensibilidade ao mesmo; apenas os extratos de alho e crisântemo apresentaram atividade bactericida; o extrato de boldo não apresentou atividade antimicrobiana; os demais extratos apresentaram atividade antimicrobiana para um ou mais dos sorovares testados.

A utilização de folhas e cascas de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e *Cordia verbenacea* (erva-baleeira) pode se constituir uma alternativa viável e acessível para o tratamento de doenças causadas por bactérias, pois os extratos hidroalcoólicos extraídos das folhas dessas plantas apresentaram atividade antibacteriana frente à bactéria *S. aureus* em concentrações que variaram de 200 mg.mL⁻¹ a 500 mg.mL⁻¹ (PINHO et al., 2012).

Miranda et al. (2013), em estudo na cidade de Viçosa (Minas Gerais), avaliaram a atividade antibacteriana de fitoconstituintes de extratos de *Gossypium hirsutum* (algodão); *Polygonum hydropiperoides* (erva de bicho); *Ageratum conyzoides* L. (mentrasto) e *Phyllanthus tenellus* (quebra pedra) e evidenciaram a presença de triterpenoides e esteroides, taninos e flavonoides nos extratos de *G. hirsutum*, *P. hydropiperoides* e *P. tenellus* que conseguiram inibir o crescimento de *S. aureus* nas concentrações de 200 e 500 mg.mL⁻¹.

Pagliarulo et al. (2016) realizaram estudo na Itália para verificar a ação antimicrobiana de extrato vegetal em cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Os autores testaram o extrato de *Punica granatum* L. (romã) contra isolados clínicos de patogênicos dos microrganismos citados e concluíram que o extrato testado possui atividade antimicrobiana eficaz, evidenciada pela inibição sobre a multiplicação de *S. aureus* e *E. coli*.

Os mecanismos de atividade antibacteriana de extratos são pouco relatados em estudos. Saritha et al. (2015) em estudo com extratos alcoólicos de *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. ex Schult, *Leucas aspera* (Wild.), *Plumbago zeylanica* L. e *Tridax procumbens* (L.) R. Br. ex Schult relataram que os mecanismos pelos quais os extratos exercem a atividade antibacteriana estão relacionados com a perturbação do potencial de membrana, entrada na célula e

até vazamento do conteúdo celular bacteriano. Para a avaliação da atividade de um composto puro ou extrato *in vitro* é necessário realizar testes e os mais comuns são teste de disco-difusão em ágar e diluição em caldo (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

O método de disco-difusão é bastante utilizado para a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos naturais contra bactérias e fungos. A técnica consiste na inoculação do ágar com microrganismo previamente padronizado e posterior inserção de discos de papel com uma quantidade da substância antimicrobiana a ser testada. O resultado será observado por meio do surgimento de um halo de inibição que tem seu diâmetro medido e depois o resultado do teste é interpretado. A técnica de microdiluição por sua vez, é utilizada para estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes produtos frente a bactérias e fungos, esta é a menor concentração em contato por 24 horas que mantém ou reduz a viabilidade do inóculo (CALVO et al., 2011).

O teste de microdiluição em caldo é feito em uma placa de 96 poços, contendo diluições de diferentes agentes antimicrobianos e inóculo previamente padronizado. Nesta técnica alguns poços servem para os controles positivo e negativo (STEPHAN et al., 2005). De acordo com Nasir et al. (2015) o teste de diluição é um teste econômico e possui resultados que podem ser reproduzidos razoavelmente, por isso é considerado método de referência para testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro*.

No Brasil existe uma grande diversidade de plantas que podem ser estudadas com ensaios biológicos que possam determinar seu potencial antimicrobiano. Uma planta que tem sido descrita na literatura por apresentar atividade antibacteriana é *A. heterophyllus*, no entanto ainda existem poucos estudos relacionados ao potencial antimicrobiano desta planta (CAVALCANTE et al., 2013; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; LOIZZO et al., 2010; MIRANDA et al., 2013).

***Artocarpus heterophyllus* Lam.**

Angiospermas são plantas vasculares que produzem sementes e possuem flores como estruturas reprodutivas. Essas plantas são encontradas em quase todos os tipos de habitats e exibem uma grande variedade de formas de vida,

dentre as quais podem ser citadas árvores, ervas aquáticas submersas, bulbos e epífitas. Existem aproximadamente 352.000 espécies de angiospermas, sendo que estas pertencem a 405 famílias e 14.559 gêneros. A família Moraceae pertence ao grupo das angiospermas, possui 40 gêneros e 4.877 espécies, *A. heterophyllus* é uma dessas espécies (THE PLANT LIST, 2013).

A. heterophyllus (figura 2) é uma planta nativa da Índia (ELEVITCH; MANNER, 2006), porém pode ser encontrada em todas as regiões do Brasil (DÓREA et al., 2013; ROMANIUC NETO et al., 2015). Essa árvore atinge um tamanho médio de 8-25 metros (m) de altura e 30-80 centímetros (cm) de diâmetro e possui uma copa irregular com diâmetro 3,5-6,7 m que forma uma sombra densa. Quando injuriada libera um látex branco (ELEVITCH; MANNER, 2006); as folhas são lustrosas, verdes escuras na parte superior e verde pálido na parte inferior, dispostas em ramos horizontais ou em espiral ascendentes; as flores estão dispostas em inflorescências. A planta começa a florescer e frutificar entre 2-8 anos após o plantio, a quantidade de flores e frutos aumentam com o crescimento da árvore e os frutos amadurecem entre 80 e 160 dias (ORWA et al., 2009).

Figura 2 – Fotografia de *Artocarpus heterophyllus* Lam.



Fonte: Acervo do projeto.

A. heterophyllus possui sazonalidade específica, pois se concentra entre os meses de dezembro a abril (SOUZA et al., 2009). O fruto de *A. heterophyllus* (jaca) é composto por um sincarpo externo de coloração amarelo-marrom, com ápices hexagonais sem rodeios cônicos que cobrem a parte interna. A parte comestível são frutículos de coloração branco-amarelada que cobrem cada semente, quando madura tem sabor ácido-adocicado. A jaca é mantida por um cilindro fibroso central, apresenta peso de 4,5 - 30 kg, com formato oblongo-cilíndrico e 30-40 cm de comprimento (ELEVITCH; MANNER, 2006).

O fruto (figura 3), possui uma composição centesimal de 88 Kcal, 1,4g de proteína, 0,3 g de lipídios, 22,5 g de carboidrato, 2,4 g de fibras, 11mg de cálcio, 40 mg de magnésio, 14 mg de fósforo, 0,4 mg de ferro, 2 mg de sódio, 234 mg de potássio, 14,8 mg de vitamina C (TACO, 2011). Também contem vitamina A 279 UI, podendo ser consumida de várias formas, in natura, cozida, seca, em calda, em saladas. As sementes podem ser consumidas cozidas ou assadas e uma vez moídas podem servir para a fabricação de farinha para pães e biscoitos (BRASIL, 2015; CRANE; BALERDI; MAGIRE, 2002). A partir de *A. heterophyllus* podem-se obter alimentos, madeira, forragem, combustível, produtos medicinais e industriais, características que tornam essa árvore economicamente importante (ICUC, 2003).

Figura 3 – Fotografia da jaca fruto característico de *Artocarpus heterophyllus* Lam.



Fonte: Acervo do projeto



Fonte: <http://www.si-seeds.com>

Loizzo et al. (2010) em estudo no Sri Lanka evidenciaram atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato aquoso, fração aquosa e fração de acetato de etila da folha de *A. heterophyllus* frente a microrganismos patogênicos. Navarro-Garcia et al. (2012) encontraram importante atividade de extrato de acetona de *A. heterophyllus* frente a *S. aureus* sensível a meticilina, a CIM foi de

0,375 mg.mL⁻¹. De acordo com Pereira e Kaplan (2013) *A. heterophyllus* tem ação antiinflamatória, antiglicêmica, despigmentante, antioxidante, antiviral e antiagregante.

Khan, Omoloso e Kihara (2003) realizaram a partição de extratos metanólicos de *A. heterophyllus* e evidenciaram a presença de flavonoides, taninos, alcaloides e saponinas. Ao passo que Cavalcante et al. (2013) realizaram o *screening* fitoquímico de extratos hidroalcoólicos das folhas e casca do caule da mesma planta e evidenciaram a presença de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, terpenos e esteroides. Delphin et al. (2014) realizaram *screening* fitoquímico etanólicos da semente de *A. heterophyllus* e detectaram a presença de saponina, tanino, terpenoide e flavonoide.

Diante do exposto, o uso de extratos de *A. heterophyllus* frente a bactérias é uma alternativa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos que possam ter uma ação contra patógenos de importância clínica, que por vezes apresentam resistência aos antimicrobianos convencionais, sendo este um problema de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ADDIS, M.; SISAY, D. A Review on Major Food Borne Bacterial Illnesses. **Journal of Tropical Diseases & Public Health.**, v.3, n.176, p.1-7, 2015.
- AHMAD, M.; WAJID, M. Plants as potential source of antimicrobial agents. **Journal of Pharmacy and Alternative Medicine**, v.2, n.3, p. 18-26, 2013.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6, p.71-79, 2016.
- BAMBEKE, V. F.; BALZI, E.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 457–70, 2000.
- BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v.196, p.44-68, 2017.
- BARBOSA, L.J. et al. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street Markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 372-378, 2016.
- BASAK, S.; SINGH, P.; RAJURKAR, M. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. **Journal of Pathogens**, v.2016, p.1-5, 2016.
- BLAIR, J.M.A.; PIDDOCK, M.J.V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. **American Society for Microbiology**, v.7, n.4, p.1-6. July/August. 2016.
- BLAIR, J.M.A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 43-51, 2015.
- BONA, E. de. A. M. de. et al. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais Frente a Sorovares de *Salmonella* spp. de Origem Avícola. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.1, p. 41-6, 2013.
- BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum -Lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.1, p. 1-14, 2004.
- BOUCHET, P.; SARTORE, A.F.; RESENBERG, G. **World Register of Marine Species**. *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819). In: Mollusca Base. 2016. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=533145> on 2017-02-19>. Acesso em: 18 fev. 2017.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n.12, p. 894-896, 2014.

BRASIL. Decreto de 11 de agosto de 2000. Cria a Reserva Extrativista Marinha da Baía do Iguape, nos Municípios de Maragogipe e Cachoeira, Estado da Bahia, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 ago.2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. 2011. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2017.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **1º Anuário Brasileira da Pesca e aquicultura**. 2014. Disponível em:< http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde -MS. Secretaria de vigilância em saúde – SVS. Departamento de vigilância epidemiológica – DEVIT. Coordenação geral de doenças transmissíveis – CGDT. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar- UVHA. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde -MS. Secretaria de vigilância em saúde – SVS. Departamento de vigilância epidemiológica – DEVIT. Coordenação geral de doenças transmissíveis – CGDT. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar- UVHA. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2017.

CALVO, M.A.. et al. Antimicrobial activity of plant natural extracts and essential oils. **Formatex Research Center**, p.1179-1185A, 2011.

CAMILO, V.M.A. et al. Processamento artesanal de sururu (*Mytella guyanensis*) pelas marisqueiras da RESEX Baía do Iguape: avaliação da qualidade antes e após intervenção educativa. **Vigilância Sanitária em Debate:Sociedade,Ciência & Tecnologia**, v.4, n.4, p.34-42, 2016.

CAVALCANTE, G.M. et al. Atividade antimicrobiana de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) sobre o desenvolvimento de *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, v. 9, n. 2, p.1-7, 2013

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Enterotoxigenic E. coli (ETEC)**.2014.Disponível em:< <https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>>.Acesso em: 15 abr. 2017.

CDC.Centers for Disease Control and Prevention. **Escherichia coli**.General information.2015.Disponível em:<<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>.Acesso em: 22 mar. 2017.

CLEMENTS, A. et al.Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n.2, p.71–87, march/april. 2012.

COSTA, A.S. Escherichia coli in seafood: A brief overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.4, p 450-454, 2013.

COX, G; WRIGHT, G.D.Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, p. 287-292, 2013.

CRANE, J. H.; BALERDI, C. F.; MAGIRE, I.**The Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) in Florida**. 2002. Disponível em:< <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/ed/ed37000.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

CROFTS, T.S.; GASPARINI, A.J.; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome.**Nature Reviews Microbiology**, v.15, p 422-434, 2017.

CROXEN, M.A.; FINLAY,B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p 26-38, dec. 2009.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, p.7313-7352, 2010.

DAVIES, J.; DAVIES,D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v, 74, n.3, p. 417-433, sep. 2010.

DELPHIN, D.V. et al. Phytochemical Screening of Various Ethanolic Seed Extracts. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.7, p.1041-1048, 2014.

DÓREA, J. R. R. et al. Composição bromatológica e dinâmica de fermentação da silagem de jaca. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1967-1976, jul/ago. 2013.

ELEVITCH, C.R.; MANNER, H. I. **Species profiles for Pacific Island Agroforestry. *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit)**. 2006. Disponível em: <<http://agroforestry.org/images/pdfs/A.heterophyllus-jackfruit.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2017.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S. et al. Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias do Pescado Comercializado no Município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 3, p. 86-95, jul-set. 2012.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S. et al. Presença de enteropatógenos resistentes a antimicrobianos em ostras e sururus da Baía do Iguape, Maragogipe (Bahia).

Revista Acadêmia: Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 25-34, jan./mar. 2014.

FARROKH, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 190-212, 2012.

FIGUEREDO, A.C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, p.213-226, 2008.

FRANCO, B. D. G. de. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 176p.

FREITAS FILHO, E.G. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from healthy dairy cattle in Mid-West Brazil: occurrence and molecular characterization. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.1, p.24-28, janeiro. 2014.

FREITAS, F. et al. Qualidade Sanitária de Sururu (*Mytella guyanensis*) Beneficiado por Comunidade Quilombola. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 33, n. 2, jul/dez. 2015.

FRIEDMAN, M. Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n.15, p.3805-3822, 2015.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev. Bras. Farm.**, v.18, n.4, p. 627-641, Out/Dez. 2008

GARCIA, A.A.; CARRIL, E.P-U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n.3, p.119-145, 2009.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133, n.3, p.1-4, 2013.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. **Infection and Immunity**, v.73, n. 5, p. 2573–2585, may. 2005.

GHOSH, P.K.; ALI, A. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhoea in Delhi and the National Capital Region, India. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.1156-1162, 2010.

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

GOUVEA, D.R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniaceae) leaves. **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012.

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

HARTLANG, E.L.; LEONG, J.M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, n.15, p.1-3, April.2013.

HEIDARY, M.; MOMTAZ, H.; MADANI, M. Characterization of Diarrheagenic Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* Isolated From Pediatric Patients in Tehran, Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.16, n.4, p. 1-7, 2014.

HERNANDO-AMADO, S. et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 13–27, 2016.

HUANG, Y. et al. The Biosynthesis and Genetic Engineering of Bioactive Indole Alkaloids in Plants. **Journal Plant Biology**, v.59, p.203-214, 2016

HU, J.; TORRES, A.G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clinical Microbiology and Infection**, v.21, p.729-734, 2015.

ICUC. International Centre for Underutilized Crops Report, Department of Civil and Environmental Engineering. **Fruits for the future jackfruit**.2003. Disponível em :< <http://www.fruits.soton.ac.uk/files/2012/01/jackfruit-factsheet.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2017.

ISERI, I. et al. The Prevalence of Enterotoxigenic *E. coli* Isolated From The Stools of Children Aged 0-10 Years With Diarrhea in Mid-Anatolia region, Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.243-247, 2011.

JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.73, n.4, p. 750–774, Dec. 2009.

KAPER, J.B; NATARO, J.P; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n.2, p.123-40, 2004.

KARMALLI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, p.360–370, 2010.

KHAN, M.R.; OMOLOSO, A.D.; KIHARA, M. Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllus*. **Fitoterapia**, v.74, p.501-505, 2003.

KUMAR, A.; SCWEIEZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p.1486–1513, 2005.

LIM, J.Y.; YOON, J.; HOVDE, C.J. **A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157**. *Journal of Microbiol and Biotechnology*, v.20, n.1, p.5-14, January.2010

LOIZZO, M. R. et al. Antioxidant and antibacterial on food borne pathogens of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) leaves extracts. **Journal of Food Science**, v.75, n.5, p.291-295, 2010.

MACHADO, A.L. et al. Resistência Antimicrobiana em Cepas de *Escherichia coli* Isoladas de Pescado Marinho Comercializado na Feira Livre do Mucuripe - Fortaleza-CE, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n.4, p.931–943. São Paulo, 2015.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 987p.

MANUEL. et al. Antimicrobial activity of artocarpesin from *Artocarpus heterophyllus* Lam. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.34, p. 4879-4882, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ministério da Pesca e Aquicultura. Instrução Normativa Interministerial nº 07, de 8 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 mai. 2012.

MARTINS, V.S.; SOUTO, F.J.B. Uma Análise Biométrica de Bivalves Coletados por Marisqueiras no Manguezal de Acupe, Santo Amaro, Bahia: uma Abordagem Etnoconservacionista. **Sitientibus Série Ciências Biológicas (Etnobiologia)**, v. 6, p.98-105, 2006.

MIRANDA, G.S.et al. C.A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu, v.15, n.1, p.104-111, 2013.

MOSES, T. et al. A. Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro. **New Phytologist**, v.200, p.27-43, 2013.

MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.2, p. 1-37. April. 2016.

NABU, S. et al. Proteochemometric model for predicting the inhibition of penicillin-binding proteins. **Journal of Computer- Aided Molecular Design**, v.29, p.127-141, 2015.

NASIR, B. et al. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. **Austin Journal of Microbiology**, v.1, n.1, p.1-12, 2015.

NAVARRO-GARCIA, V.M. et al. Antimicrobial activity of artocarpesin from *Artocarpus heterophyllus* Lam. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.34, p. 4879-4882, september.2012.

NEWELL, D.G. et al. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p.3-15, 2010.

NOBREGA, G.S. et al. Formação para marisqueiras em segurança de alimentos e saúde do trabalhador: uma experiência na comunidade de Ilha do Paty, Bahia, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.19, n. 5, p.1561-1571, 2014.

OCHOA,T.J.; CONTRERAS,C.A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.24, n.5, p.478-483, october.2011.

OGBEMUDIA, F.O.; THOMPSON, E.O. Variation in Plants Secondary Metabolites and Potential Ecological Roles – A Review. **International Journal of Modern Biology and Medicine**, v.5, n.3, p.111-130, 2014.

OLANIRAN, A.O.; NAICKER, K.; PILLAY, B. Toxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*: Classification, pathogenesis and virulence determinants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, N.4, p. 94-100, April.2011.

OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives e A mini-review. **Food Control**, v.22, p. 805-815, 2011.

OLIVOTO, T. et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n.2, p.71-74, jan. 2017.

OMOJATE, G.C. et al. Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens – A Review. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v.2, n.2, p.77-85, aug.2014.

ORWA et al. **Artocarpus heterophyllus Lam. Moraceae**.2009. Disponível em:< http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Artocarpus_heterophyllus.PDF >. Acesso em: 13 abr 2017.

PAGLIARULO, C. et al. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food. Chemistry**, v. 190, p. 824-831, 2016.

PAULA, C.M.D.de.; CASARIN, L.S.; TONDO, E.C. *Escherichia coli* O157:H7 — patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v.2, n.04, p.23-33, 2014.

PAURMAND, A. et al. Emerging trends in antibiotic resistance: Implications for emergency medicine. **American Journal of Emergency Medicine**, 2017. No prelo.

PAVARINI, D.P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, n. 1, p.5-16, 2012.

PENA, P.G.L.; FREITAS, M.do.C.S.de.; CARDIM, A. Trabalho artesanal, cadências infernais e lesões por esforços repetitivos: estudo de caso em uma comunidade de mariscadeiras na Ilha de Maré, Bahia. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.8, p.3383-3392, 2011.

PENNINGTON, H.T. *Escherichia coli* O157. **The Lancet**, v.376, p.1428-35, 2010.

PEREIRA, A.P. et al. Microbiological Quality of Oysters (*Crassostrea gigas*) Produced and Commercialized in the Coastal Region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, C. S. et al. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro-RJ,

Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.2, p. 387-390, abr/jun. 2007.

PEREIRA, O.M. et al. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do estuário de ilha comprida – SP – Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.29, n.2, p. 139 - 149, 2003.

PEREIRA, V de. J.; KAPLAN, M. A.C. *Artocarpus*: Um Gênero Exótico de Grande Bioatividade. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n.1, p.1-15, 2013.

PINHO, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 326-331, fev. 2012.

PINTO, T.R.; BOEHS, G. *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae) da Região Estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 95-100, 2008.

RADUSIENE, J.; KARPAVICIENE, B.; STANIUS, Z. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in st. john's worth. **Botanica Lithuanica**, v.18, n.2, p.101-108, 2012.

RAMIREZ, M.S.; TOLMASKY, M.E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Drug Resist Updat**, v.13, n. 6, p.151-157. Dec.2010.

RASHEED, M.U. et al. Antimicrobial Drug Resistance in Strains of *Escherichia coli* Isolated From Food Sources. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.56,n.4, p.341-346, July-August. 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REYGAERT, W.C. Insights on the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. **Advances in Clinical and Medical Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016.

RIVERA, F.P. et al. Genotypic Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Causing Traveler's Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.2, p. 633– 635, feb.2013.

ROCA, I. et al.The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 16, n.6,p. 22-9, july.2015.

ROJAS-HERRERA, R.A.; GONZÁLEZ-FLORES, T. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. **Bioquímica**, v.31, n. 2, p. 69-76, 2006.

ROMANIUC NETO, S. et al. *Moraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.2015.Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB85712>>. Acesso em: 08 abr. 2017.

ROMERO, D. et al. Antibiotics as Signal Molecules. **Chemical Reviews**,v.14, n.9, p.5492-4405, Sep.2011.

ROUSSEL, C. et al. Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli*: from gut pathogenesis to new preventive strategies involving probiotics. **Future Microbiology**, v.12, n.1, p.73-93, 2017.

SARITHA, K. et al. Mechanism of antibacterial action of the alcoholic extracts of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. ex Schult, *Leucas aspera* (Wild.), *Plumbago zeylanica* L., and *Tridax procumbens* (L.) R. Br. ex Schult. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.577, p.1-9, 2015.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v.7, n.8, p.979-980, 2012.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Aquicultura no Brasil: Série Estudos Mercadológicos**.2015. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)>. Acesso em: 15. Mai 2017.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types epidemiology, and treatment. **Saudi journal Biological Sciences**, v.22, n.1, p.90-101,2015.

SHARMA, A.; GUPTA,P.;VERMA, A.K. Preliminary nutritional and biological potential of *Artocarpus heterophyllus* L. shell powder. **Journal Food Science and Technology**, v.52, n.3, p.1339-49, 2013.

SILVA-JÚNIOR, A.C.S. et al. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* e coliformes termotolerantes em Jaraqui, *Semaprochilodus brama* (Valenciennes, 1850) comercializado na Feira do Pescado, Macapá-AP. **Biota Amazônia**, v.5, n.1, p.32-36, 2015.

SILVEIRA, L.M.S. et al. Atividade antibacteriana de amostras de fruto do noni (*morindacitrifolia* . l - rubiaceae) vendidas em feiras livres de São Luís, Maranhão. **Revista Ciência & Saúde Coletiva.**, v.2, n.1, p.31-37, 2011.

SOUZA, C.de.O. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**,v.7, n.2, p.79-91, 2016.

SOUZA, M.M.M.de. et al. Avaliação do Frescor do Pescado Congelado Comercializado no Mercado Municipal de São Francisco do Conde- BA. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, n.4, p.359 – 368, 2013.

SOUZA, T. S. et al. Desidratação osmótica de frutículos de jaca (*Artocarpus integrifolia* L.): aplicação de modelos matemáticos. **Acta Scientiarum.Technology**, Maringá-PR, v.31, n.2, p.225-230, 2009.

STEPHAN et al. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. **American Society for Microbiology**. 2005. Disponível em: <file:///C:/Users/Lapis/Downloads/NCCLS%20Manual%20of%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Testing%20(1).pdf>. Acesso em: 13 abr. 2017.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA-UNICAMP, p. 161, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada>. Acesso em: 08 abr. 2017.

TCHAPTCHET, S; HANSEN, J. The Yin and Yang of host-commensal mutualism. **Gut Microbes**, v.2, n.6, p.347-352, 2011.

TEVA, A. et al. **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. 1.ed. Rio de Janeiro:EPSJV,IOC, 2009.

THE PLANT LIST. **A working list of all plants species**. 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/#statistics>>. Acesso em: 08 abr. 2017.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n.5, p.508-513, May, 2002.

TURNER, S.M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.263, p.10-20, 2006.

WEBBER, M.A.; PIDDOCK, L.J.V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 9-11, 2003.

WENNING, M. et al. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v.103, p.44-52, 2014.

WHO. **Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance**. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2016.

WHO. **Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2017.

WONG,A.R.C. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.80, n.6, p.1420-1438, 2011.

YOON,J.W.; HOVDE, C.J. All blood, No stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Journal of Veterinary Science**, v.93, n.3, p.219-231, 2008.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and b-lactam resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, p.361-385, 2008.

ZHANG, H.N.et al. Prevalence of Foodborne Pathogens in Cooked Meat and Seafood from 2010 to 2013 in Shandong Province, China. **Iran Journal of Public Health**, v. 45, n.12, p.1577-1585, dec. 2016.

ZHANG, W.J.; BJORN, L.O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. **Fitoterapia**, 2009.

ZIEGLER, J; FACCHIN, P.J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.735–769, 2008.

CAPÍTULO 2

Escherichia coli* em *Mytella guyanensis* e sensibilidade a antimicrobianos comerciais e extratos de *Artocarpus heterophyllus

***Escherichia coli* EM *Mytella guyanensis* E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS
COMERCIAIS E EXTRATOS DE *Artocarpus heterophyllus***

RESUMO - *Escherichia coli* é um importante patógeno humano, responsável pelo desenvolvimento de gastroenterites que variam de leve a severa. A sua presença em alimentos como o sururu (*Mytella guyanensis*) é indicativo de contaminação fecal, sendo, portanto uma grande preocupação. O trabalho objetivou isolar *E. coli* em amostras de *M. guyanensis* e testar a sensibilidade a antimicrobianos comerciais e extratos vegetais das folhas e casca de *Artocarpus heterophyllus* Lam. As 12 amostras de *M. guyanensis* foram oriundas de dois mercados e dois pontos de venda da feira livre de Cachoeira, Bahia, Brasil, coletadas no período de dezembro de 2015 e janeiro de 2016. A população de *E. coli* foi estimada pelo método de contagem rápida Petrifilm™ (3M Company). O perfil de sensibilidade a antimicrobianos comerciais e extratos vegetais foi realizado pelo teste de disco-difusão e microdiluição em caldo, respectivamente. A contagem de *E. coli* variou entre <1 a 4,0 log UFC.g⁻¹ para as amostras dos mercados e <1 a 4,8 log UFC.g⁻¹ para as amostras da feira. Houve uma tendência para diferença significativa entre as médias das contagens de *E. coli* (p=0,055) para as amostras dos mercados e da feira. Foram encontradas quatro cepas resistentes a sulfazotrim, uma cepa resistente a gentamicina e uma cepa com resistência intermediária para amoxicilina-ácido clavulânico. Os extratos de *A. heterophyllus* não mostraram atividade antibacteriana pelo ensaio de microdiluição em caldo. O consumo de *M. guyanensis* sem boas práticas de manipulação e armazenamento adequados representa riscos para a saúde do consumidor, pela possibilidade de estar contaminado por *E. coli* resistente a antimicrobianos.

Palavras-chave: Doença. Suscetibilidade. Resistência. Jaqueira.

***Escherichia coli* IN *Mytella guyanensis* AND SENSITIVITY TO COMMERCIAL
ANTIMICROBIALS AND EXTRACTS OF *Artocarpus heterophyllus***

ABSTRACT - *Escherichia coli* is an important human pathogen, responsible for the development of gastroenteritis that can range from mild to severe. Its presence in foods such as mussel (*Mytella guyanensis*) is an indicative of fecal contamination and it is, therefore, a major concern. This work aimed to isolate *Escherichia coli* in *M. guyanensis* samples and to test its sensitivity to commercial antimicrobials and to plant extracts from leaves and stem barks of *Artocarpus heterophyllus* Lam. All twelve samples of *M. guyanensis* were collected between December 2015 and January 2016, and they all came from two markets and two stands from a free market in Cachoeira, Bahia, Brazil. *E. coli* population was estimated by Petrifilm™ (3M Company) rapid count method. Sensitivity profiles to commercial antimicrobials and to plant extracts were obtained by disk diffusion method and broth microdilution, respectively. *E. coli* count ranged from <1 to $4.0 \log \text{CFU.g}^{-1}$ for market samples and <1 to $4.8 \log \text{CFU.g}^{-1}$ for free market samples. There was a trend for the significant difference as averages of *E. coli* counts ($p = 0.055$) for market and fair samples. Four trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strains, a gentamicin resistant strain and a strain with intermediate resistance to amoxicillin-clavulanic acid were found. *A. heterophyllus* extracts showed no antibacterial activity at the broth microdilution assay. The consumption of *M. guyanensis* without good handling and storage practices poses a risk to the consumer's health due to the possibility of being contaminated by antimicrobial resistant *E. coli*.

Keywords: Illness. Susceptibility. Resistance. Jackfruit.

INTRODUÇÃO

A pesca artesanal é uma importante fonte de renda e subsistência para famílias ribeirinhas. Dentre o pescado capturado está o sururu da espécie *Mytella guyanensis* (PROST, 2010) e esse pescado é uma excelente fonte de nutrientes (SOARES; GONÇALVES, 2012).

No entanto é um alimento que pode ser contaminado no ambiente ou durante a manipulação, sendo veículo de microrganismos que podem trazer riscos a saúde dos consumidores (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2011). O uso de boas práticas durante o processamento do sururu pode garantir um produto adequado para o consumidor. Boas práticas são procedimentos que devem ser adotados durante a produção

de alimentos, com o objetivo de garantir a qualidade higiênico-saniária e conformidade dos mesmos com a legislação vigente (BRASIL, 2004).

No entanto, nem sempre essas práticas são adotadas durante as etapas de processamento de *M. guyanensis*, o que aumenta os riscos de contaminação por microrganismos (CAMILO et al., 2016). Desta forma são necessárias estratégias para o monitoramento da qualidade sanitária desse molusco e a análise microbiológica é uma boa ferramenta, destacando-se *Escherichia coli* como um indicador de contaminação fecal (RAMOS et al., 2010).

E. coli também é um importante agente causal de infecções pelo consumo de alimentos contaminados (NEWELL et al., 2010). Essa bactéria também está relacionada a casos de resistência a antimicrobianos (RASHEED et al., 2014). A resistência bacteriana a antimicrobianos é um problema mundial de saúde e seu enfrentamento requer a busca por novos agentes antimicrobianos (OMS, 2012).

As plantas têm sido bastante utilizadas na busca de novas soluções terapêuticas por possuírem substâncias bioativas (BETTEGA et al., 2011). Dentre as plantas estudadas estão as do gênero *Artocarpus* fonte de compostos de importância para a medicina. Uma importante espécie desse gênero é *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jaqueira) utilizada na medicina popular como: antitérmico, antisifilís, antiparasitário, bem como para tratamento de: úlcera, cicatrização de feridas, anemia, asma, dermatite, diarreia e tosse (JAGTAP; BAPAT, 2010). *A. heterophyllus* também tem sido estudada por possuir compostos que exercem atividade biológica contra microrganismos patogênicos para humanos (PAIVA et al., 2010; SINVAGNANASUNDARAM; KARUNANAYAKE, 2015).

Considerando a escassez de estudos de isolados de *E. coli* quanto à sensibilidade a antimicrobianos comerciais e naturais, o trabalho teve como objetivo isolar *E. coli* em amostras de *M. guyanensis* e testar a sensibilidade a antimicrobianos comerciais e extratos de jaqueira (*A. heterophyllus*).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sururu foram adquiridas no período de dezembro de 2015 a janeiro de 2016 no município de Cachoeira, Bahia, Brasil, provenientes de quatro comerciantes, sendo dois de mercados e dois de pontos de venda da feira livre realizaram-se três coletas totalizando 12 amostras. Um quilo de sururu *M. guyanensis* pré-coccionado de cada comerciante foi acondicionado em saco plástico de primeiro uso devidamente etiquetado e

transportado sob refrigeração para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Segurança Alimentar e Nutricional no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Santo Antônio de Jesus, sendo as amostras imediatamente analisadas.

A população de *E. coli* foi estimada por meio do método de contagem rápida Petrifilm™ (3M Company), utilizando placas EC (AOAC 998.08). De cada amostra foi retirada 25 g e adicionada em 225 mL de solução salina 0,9 % de NaCl. Esta mistura foi homogeneizada e foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} . A contagem das colônias foi realizada em contador modelo CP600 Plus (Phoenix®) e os resultados foram expressos em log UFC.g⁻¹. Colônias características de *E. coli* foram purificadas em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) Kasvi® (SILVA et al., 2007) e preservadas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol a 15 % e acondicionadas a - 20° C (SILVA et al., 2011).

Para a obtenção dos extratos vegetais foram adquiridas amostras vegetais (folhas e casca) na Pumba, bairro da zona rural do município de Cruz das Almas, Bahia situado na latitude de 12° 38'53,73" Sul e longitude de 39° 09'13" Oeste. As partes da planta foram coletadas pela manhã (7h), acondicionadas em sacos de polietileno de primeiro uso e levadas ao laboratório de Fitoquímica do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) /UFRB. O método de herborização adotado foi o preconizado por Machado e Barbosa (2010). A exsiccata da espécie foi depositada no Herbário do Recôncavo da Bahia (HURB) com voucher número 13781.

O material vegetal (folhas e casca) foi separado, sendo eliminadas as folhas amareladas, areia e outros contaminantes. Após esse processo, folhas e cascas (1 kg de cada) foram pesadas em balança semi-analítica Bel® M503 e secas em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C até peso constante. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas Fortinox® modelo STAR FT-50 e armazenadas em sacos de papel mantidos em temperatura ambiente até o momento das análises (BOMBA et al., 2015).

Após secagem e trituração as folhas e cascas do caule (200 g) foram submetidas à extração exaustiva por maceração a frio com hexano em Erlemeyer durante 72 horas. A quantidade de solvente colocado sobre o material vegetal foi o suficiente para cobrir a amostra e os recipientes ficaram armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz durante a maceração. Após esse período, realizou-se a filtração em papel de filtro qualitativo e os extratos foram concentrados com pressão reduzida em rotaevaporador Warmnest® RE-52A a uma temperatura constante de 40 °C, obtendo-se o Extrato Bruto Hexânico (EBH). O processo foi repetido por três vezes.

A mesma amostra vegetal foi submetida à extração por maceração a frio utilizando o solvente metanol, realizando-se os mesmos procedimentos para a obtenção do Extrato Bruto Metanólico (EBM) (BOMBA et al., 2015). O EBM obtido foi suspenso em metanol e água, em seguida foi particionado em funil de separação com solventes de polaridade crescente: diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt). Posteriormente, os extratos foram submetidos à pressão reduzida por meio da rotaevaporação em temperatura constante de 40 °C e foram obtidas as frações de diclorometano e acetato de etila (SEPTAMA; PANICHAYUPAKARANANT, 2015). Os extratos foram mantidos protegidos da luz em refrigeração até o momento das análises.

A triagem fitoquímica foi realizada para detectar a presença de flavonoides, tanino, esteroides/triterpenoide, saponina e alcaloide.

Para a detecção de flavonoides, foram adicionados no tubo de ensaio 2 mg do extrato e dissolvido com 2 mL de metanol, adicionou-se 10 gotas do ácido clorídrico concentrado e 0,5 cm de fita de magnésio. A coloração marrom, rosa ou avermelhada indica a presença de flavonoide. Já para a detecção de tanino adicionou-se no tubo de ensaio 2 mg do extrato que foi dissolvido em 2 mL de metanol e inseriu-se três gotas de solução alcoólica de cloreto de ferro (FeCl_3). A formação da coloração verde indica a presença de tanino (AZEVEDO et al., 2014).

Para a detecção de saponina foram adicionados no tubo de ensaio 2 mg do extrato dissolvido em 2 mL de metanol, acrescentou-se 5 mL de água destilada, em seguida agitou-se vigorosamente. A formação de espuma persistente e abundante sobre o aquecimento em banho-maria por 5 minutos, indica a presença de saponina (AZEVEDO et al., 2014).

Para identificação de triterpenoide e esteroide pelo método de Liebermann-Burchard foram utilizados 2 mg do extrato que foi dissolvido em 2 mL de metanol, inseriu-se 2 mL de clorofórmio, e em seguida, 1 mL de anidro acético. Agitou-se suavemente e adicionou-se pelas paredes do tubo 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Um anel castanho é formado na junção de duas camadas e a camada superior verde indica a presença de esteroide, já a formação de cor vermelha intensa indica a presença de triterpenoide (JOSHI; BHOBE; SATTARKAR, 2013).

Para a identificação dos mesmos compostos pelo método de Salkowski foram adicionados no tubo de ensaio 2 mg do extrato dissolvido em 2 mL de metanol, adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico. A cor vermelha indica a presença de esteroide e a cor amarela indica a presença de triterpenoide (JOSHI; BHOBE; SATTARKAR, 2013). Para

determinação de alcaloides, 2 mg do extrato dissolvido em 2 mL de metanol e foi alcalinizado com 15 gotas de hidróxido de sódio a 1% e acrescidos de 2 mL de água e 2 mL de clorofórmio. A fração aquosa foi desprezada e a fração clorofórmica acrescida de 15 gotas de ácido clorídrico a 1%, e em seguida extraída com 2 mL de água. A fração clorofórmica foi desprezada e os testes realizados com a fração aquosa ácida, acrescentando-se 3 gotas do reagente de Drangendorff para a verificação da presença de alcaloides. A formação de precipitado laranja ou laranja avermelhado indica a presença de alcaloide (AZEVEDO et al., 2014).

O teste de sensibilidade foi realizado no Laboratório de Análise de Alimentos e Ambiental (LABMAA), no (CCAAB), na UFRB. Para a triagem de sensibilidade a antimicrobianos comerciais foi realizado o teste de disco-difusão. Foram utilizados 24 isolados de *E. coli* obtidos de *M. guyanensis* e uma cepa padrão de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) CDC EDL- 933 como microrganismo teste. Uma cultura recente (24h) foi utilizada para preparo do inóculo bacteriano na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, que corresponde a 0.5 na escala de MacFarland, o qual foi ajustado em espectrofotômetro modelo SP-22 Biospectro® (comprimento de onda de 625 nm e densidade ótica de 0,08 a 0,1). O inóculo bacteriano foi semeado com *Swab* em placas de Petri contendo ágar *Mueller Hinton* e posteriormente os seguintes discos de antimicrobianos comerciais foram posicionados na superfície do meio de cultura: amoxicilina-ácido clavulânico (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), imipenem (10 µg), nitrofurantoína (300 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e sulfazotrim (25 µg) (CLSI, 2003a). As placas foram incubadas a 37 °C/ 24h e os resultados foram interpretados de acordo com os parâmetros descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005), por meio da medida dos halos de inibição.

Para cálculo do índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) número de antimicrobianos que a cepa foi resistente foi dividido pela quantidade de antimicrobianos testados (KRUMPERMAN, 1983). Índice de MAR igual ou acima de 0,2 indica múltipla resistência (MACHADO et al., 2015).

Para determinação da sensibilidade de *E. coli* aos extratos vegetais foi utilizado o teste de microdiluição em caldo, visando determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CLSI, 2003b). Os microrganismos testes (EHEC CDC EDL-933, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) CDC 086:H35, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) ATCC 11105 e o isolado (E9) foram previamente ativados em Caldo *Mueller Hinton* (CMH) Kasvi® para preparo da suspensão de trabalho. A suspensão de trabalho foi ajustada em espectrofotômetro modelo SP-22

Biospectro®, com comprimento de onda de 625 nm e densidade ótica de 0,08 a 0,1, o que corresponde a uma suspensão bacteriana na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. Esta suspensão foi diluída em CMH para obtenção de suspensão bacteriana de trabalho na concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹.

Os extratos foram diluídos em dimetilsufóxido (DMSO) e água. O controle positivo utilizado foi gentamicina 140µg.mL⁻¹ e o controle negativo foi uma solução de DMSO a 10 %. Foram testadas duas soluções de trabalho diferentes: a primeira teve concentração inicial de 2 mg.mL⁻¹ para o EBM, fração de diclorometano e fração de acetato de etila e a segunda solução a 20 mg.mL⁻¹ apenas com o EBM da folha e casca do caule. Todos os extratos foram esterilizados em membrana de celulose de 0,22 µm. Os demais controles foram: controle de esterilidade do meio de cultura, controle de viabilidade do microrganismo, controle de esterilidade dos extratos e frações.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS)[®] versão 23.0. Foi realizada análise descritiva dos dados microbiológicos e análise de variância (ANOVA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de *E.coli* variou entre < 1 a 4,0 log UFC.g⁻¹ para as amostras dos mercados e < 1 a 4,8 log UFC.g⁻¹ para as amostras da feira. A mínima, mediana e máxima estão dispostas na figura 1.

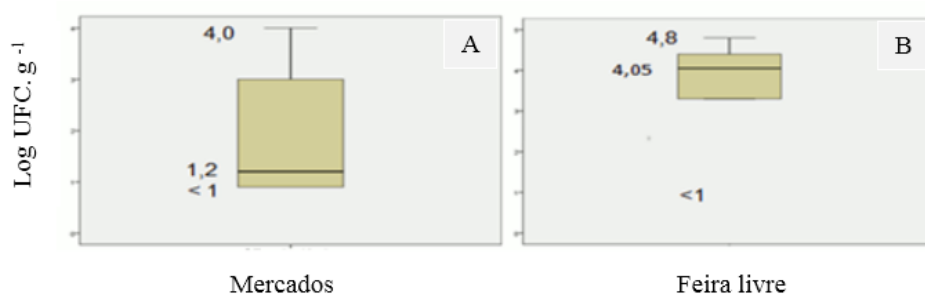


Figura 1. População de *Escherichia coli* (log UFC.g⁻¹) em amostras de *Mytella guyanensis* provenientes de mercados (A) e pontos de venda da feira livre (B) em Cachoeira entre os meses de dezembro de 2015 e janeiro de 2016.

As contagens de *E. coli* apresentaram média 1,8 (\pm 1,3) para as amostras dos mercados e 3,5 (\pm 1,4) para as amostras da feira. Houve uma tendência para diferença significativa entre as médias das contagens de *E. coli* ($p=0,055$) para as amostras dos mercados e da feira. A legislação brasileira estabelece para coliformes a 45° C 1,7 log UFC.g⁻¹ (BRASIL, 2001), que tem como principal representante a bactéria *E. coli*. No presente estudo 33,3 % das amostras do mercado e 83,3 % das amostras da feira estavam inconformes com a legislação, representando um total de 58,3 % de inconformidade.

A presença de *E.coli* acima dos níveis permitidos pela legislação nas amostras de analisadas é preocupante. De acordo com Farias et al. (2010) a presença de patógenos em moluscos bivalves indica um comprometimento das condições higiênico-sanitárias dos moluscos e também do ambiente. Para Souza et al. (2015) a presença de *E. coli* acima dos limites permitidos pela legislação indica riscos de desenvolvimento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

A maior contaminação nas amostras da feira livre infere a importância do armazenamento congelado para propiciar a qualidade satisfatória dos bivalves consumidos pela população. De acordo com Ferreira et al. (2014) as condições do armazenamento são fundamentais para evitar a multiplicação microbiana e garantir a qualidade do pescado. Para Obemeata, Nnenna e Christopher (2011) o congelamento proporciona um ambiente impróprio para a multiplicação e sobrevivência de microrganismos no pescado.

Nascimento et al. (2011), em estudo realizado com moluscos bivalves desconchados e com concha em Aracaju, encontraram contaminação acima dos limites permitidos nas amostras adquiridas desconchadas e não encontraram contaminação nas amostras em que foi realizado desconchamento em condições higiênico-sanitárias satisfatórias. Desta forma a contaminação encontrada nas amostras de sururu analisadas no presente estudo pode ter provindo da manipulação inadequada. Mafra et al. (2016) inferem a necessidade de uma maior atenção na área da segurança alimentar relacionada a bivalves, pela presença de contaminação nos mesmos.

Foram adquiridos 12 isolados de *E. coli* a partir das amostras dos mercados e 12 a partir das amostras da feira e os isolados adquiridos foram testados junto com uma cepa padrão totalizando 25 cepas. Dessas cepas de *E. coli* testadas 16 % foram resistentes a sulfazotrim, 4% foram resistentes à gentamicina e 4 % apresentaram resistência intermediária à amoxicilina-ácido clavulânico. Observou-se que 100 % das cepas foram sensíveis a ácido nalidíxico, ceftazidima, ceftriaxona, cloranfenicol, imipenem e nitrofurantoína conforme tabela 1.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade de cepa padrão de EHEC CDC EDL-933 e isolados de *Escherichia coli* provenientes de sururu *Mytella guyanensis* oriundo de mercados e de pontos de venda da feira livre de Cachoeira, Bahia, Brasil.

Antimicrobiano	HR mm	HI mm	HS mm	R%	I%	S%
Ceftazidima (30 µg)	≤ 14	15-17	≥18	0	0	100
Ceftriaxona (30 µg)	≤ 13	14-20	≥21	0	0	100
Cloranfenicol (30 µg)	≤ 12	13-17	≥18	0	0	100
Imipenem (10 µg)	≤ 13	14-15	≥16	0	0	100
Nitrofurantoína (300 µg)	≤14	15-16	≥17	0	0	100
Gentamicina (10 µg)	≤ 12	13-14	≥15	4	0	96
Sulfazotrim (25 µg)	≤ 10	11-15	≥16	16	0	84
Amoxicilina-ácido clavulânico (30 µg)	≤13	14-17	≥18	0	4	96
Ácido nalidíxico (30 µg)	≤ 13	14-18	≥19	0	0	100

HR mm =padrão de halo resistente em milímetros, HI mm= padrão de halo de resistência intermediária em milímetros, HS mm= padrão de halo de sensibilidade em milímetros, R %= cepas resistentes em percentual, I %= cepas que apresentaram resistência intermediária em percentual, S %= cepas sensíveis em percentual.

Foram encontradas seis isolados resistentes aos antimicrobianos comerciais: E2, E4,E9,E10,E11 e E14, destes, dois foram oriundos de amostras dos mercados e dois de amostras da feira resistentes a sulfazotrim, um isolado provindo das amostras de mercado resistente à gentamicina e um isolado de amostras da feira apresentou resistência intermediária a amoxicilina-ácido clavulânico.

De acordo com Vernaz et al. (2011) o sulfazotrim não é um antimicrobiano indicado no tratamento empírico de algumas infecções bacterianas pela taxa de resistência descrita. Tendo em vista que o maior percentual de resistência no presente estudo foi para esse medicamento, deve-se ter cautela ao utilizar esse antimicrobiano como primeira escolha no tratamento de infecções causadas por *E.coli*, tendo em vista que algumas cepas podem apresentar resistência.

A gentamicina é um antimicrobano usado a curto ou longo prazo para o tratamento de infecções graves, no entanto, seu uso pode ser associado a uma significativa toxicidade (AVENT et al., 2011). Foi detectada a presença de uma cepa resistente a esse antimicrobiano no presente trabalho, o que infere a necessidade de pesquisas em relação à resistência de *E.coli* a esse medicamento.

Na prática clínica a associação do ácido clavulânico a amoxicilina é uma estratégia comumente utilizada para evitar a degradação da amoxicilina pelas por enzimas bacterianas. (JAFRI et al., 2014). De acordo com Silley (2012) quando um microrganismo apresenta resistência intermediária uma infecção causada pelo mesmo pode ser tratada de forma

adequada, quando existe a possibilidade de utilizar uma dose mais elevada. Diante do exposto, infere-se a necessidade da pesquisa para detecção de cepas de *E.coli* que apresentam esse tipo de resistência ao medicamento, para que o tratamento seja realizado de forma correta.

A resistência a antibacterianos é um grave problema de saúde (ROCA et al., 2015) e não é uma ameaça apenas para o setor da saúde propriamente dito, impacta também nos setores político, econômico, biológico e social (BALSALOBRE; DROPA; MATTÉ, 2014). Nessa perspectiva, os achados de bactérias resistentes provenientes de moluscos bivalves reforçam a necessidade de práticas adequadas durante todas as etapas do processamento destes moluscos, visando evitar a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos. Para Ryu et al. (2012) existe a necessidade de uma vigilância constante relacionada a bactérias resistentes a antimicrobianos provenientes de pescado visando a garantia da segurança do mesmo.

Os moluscos bivalves podem ser contaminados por bactérias resistentes no próprio ambiente aquático (GRESVKOTT et al., 2017) durante ou após o processamento (VERREAS et al., 2013). Para Wellington et al. (2013) a contaminação da água, alimentos e do meio ambiente por bactérias resistentes ajuda na propagação desses microrganismos. De acordo com Rasheed et al. (2014) a resistência bacteriana pode se espalhar rapidamente na comunidade pela transferência de genes codificados por plasmídeos. Nenhum dos isolados apresentou múltipla resistência aos antimicrobianos.

Tendo em vista a grande preocupação com a resistência bacteriana, estudos com plantas têm sido desenvolvidos na busca por substâncias com potencial antimicrobiano, uma vez que, muitas plantas têm demonstrado potencial antimicrobiano contra microrganismos resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados (ABDALLAH, 2011). No presente trabalho foram desenvolvidos extratos de *A. heterophyllus* para a verificação da atividade antimicrobiana.

O rendimento obtido no preparo dos extratos foi 2,49 g de EBH, 11,1 g de EBM da folha e 0,43 g de EBH, 2,50 g EBM da casca. A partir das partições obtiveram-se: 0,43 g de extrato de diclorometano e 0,28 g de extrato de acetato de etila da folha e 0,14 g de extrato de diclorometano e 0,03 g de extrato de acetato de etila da casca.

A análise fitoquímica mostrou a presença de metabólitos secundários nos extratos, conforme tabela 2.

Tabela 2. Triagem fitoquímica para detecção de metabólitos secundários nos extratos vegetais das folhas e casca de *Artocarpus heterophyllus* Lam.

Compostos	Folha		Casca	
	EBH	EBM	EBH	EBM
Flavonoide	-	+	-	-
Tanino	-	+	+	+
Saponina	-	+	-	+
Esteróide (LB)	+	+	-	+
Triterpenoide (LB)	-	-	-	-
Esteróide (S)	-	-	-	-
Triterpenoide (S)	-	-	+	-
Alcaloide	-	-	+	-

- negativo, + positivo, EBM- Extrato Bruto Metanólico, EBH-Extrato Bruto Hexânico, LB=Liebermann-Burchard, S= Salkowski.

Muitos estudos estão sendo realizados com os metabólitos secundários das plantas que, pois esses compostos demonstram importantes atividades biológicas, uma delas é a atividade antimicrobiana (COMPEAN; YNALVEZ, 2014). Esta atividade tem sido demonstrada por diferentes metabólitos secundários, tais como flavonoides (KUMAR; PANDEY, 2013), tanino (SAAD et al., 2012), saponina (GACCHE; SHAIKH; PUND, 2011), esteróides, triterpenóides e alcalóides (ADUOL; OGILA; JOHN, 2014).

Não foi evidenciada a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos de *A.heterophyllus* no presente estudo. Esse resultado difere dos encontrados por Sinvaganasundaram e Kurunanayake (2015) que revelaram a existência de atividade antibacteriana de extratos de *A. heterophyllus* frente a cepas de *E. coli*. Essa atividade também foi demonstrada em estudo realizado no distrito de Colombo Sri Lanka, no qual foram testados extratos da folha de *A. heterophyllus* frente a cepas de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus*, por meio de testes de difusão em ágar e macrodiluição em caldo. Todos os extratos foram capazes de inibir a multiplicação dos microrganismos no teste de difusão em ágar na concentração de 125 mg.mL⁻¹ com exceção de *Bacillus cereus*. As CIM variaram entre 221,9 µg.mL⁻¹ e > 1000 µg.mL⁻¹ (LOIZZO et al.,2010).

Esse resultado pode estar relacionado a fatores bióticos e abióticos que inteferem na qualidade e quantidade dos metabolitos secundários (SAZKIEL; PACZOWSKI; HENRY, 2011), pois essas substâncias são sintetizadas para a adaptação a tais fatores (MEDEIROS et al., 2013; NEILSON et al., 2013). Também pode ocorrer o antagonismo entre

metabólitos secundários presentes em um extrato vegetal, isso causa a redução da atividade do mesmo (MILUGO et al., 2013).

CONCLUSÃO

A presença de cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos comerciais oriundas de *M. guyanensis* comercializados em mercados e na feira livre de Cachoeira infere contaminação ambiental e/ou contaminação pela manipulação inadequada do alimento. O consumo de *M. guyanensis* sem armazenamento adequado e boas práticas de manipulação representa riscos para a saúde do consumidor.

Os extratos de *A.heterophyllus* não foram eficazes contra as cepas de *E.coli* testadas, o que pode indicar a inatividade dos compostos químicos presentes nos extratos, quantidade insuficiente de substâncias com ação antibacteriana que podem ter sofrido influência de fatores bióticos e abióticos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, E.M. Plants: An alternative source for antimicrobials. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.6, p.16-20, 2011.
- AVENT, M.L. et al. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **International Medicine Journal**, v. 41, p. 441-449, 2011.
- ADUOL, O.M.; OGILA, K.O.; JOHN, K.Evaluation of antibacterial effects and phytochemical screening of the aqueous and methanolic extracts of *Hibiscus diversifolius*.**Jouranl Microbiology and Antimicrobials**, v.6, n.5, p.88-93, 2014.
- AZEVEDO, L.F.P.et al. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.16, n.2, p.209-215, 2014.
- BALSALOBRE, L.C.; DROPA, M.; MATTÉ, M.H. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n.1, p. 1-5, 2014.

BETTEGA, P.V.C. et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n.1, p.89-97, 2011.

BOMBA, F.D. et al. Antinociceptive properties of the aqueous and methanol extracts of the stem bark of *Petersianthus macrocarpus* (P. Beauv.) Liben (Lecythidaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.4,n.174, p.66-73, nov.2015..

BRASIL. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. 12 jan.2001.

BRASIL.Resolução RDC nº216 de 15 de setembro de 2004. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF.16 set. 2004.

CAMILO, V.M.A.et al. Processamento artesanal de sururu (*Mytella guyanensis*) pelas marisqueiras da RESEX Baía do Iguape: avaliação da qualidade antes e após intervenção educativa. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v.4, n.4, p.34-42, 2016.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard— Eighth Edition.CLSI document M2-A8 CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute . **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 .CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b.

CLSI.Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15.CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

COMPEAN, K.L.; YNALVEZ, R.A. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites : A review. **Research Journal of Medicinal Plant**, v.14, p.1-10, 2014.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S. et al. Presença de enteropatógenos resistentes a antimicrobianos em ostras e sururus da Baía do Iguape, Maragogipe (Bahia). **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 25-34, jan./mar. 2014.

FARIAS, M.F.de. et al. Condições Microbiológicas de *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) (Mollusca: bivalvia: solecurtidae) e da Água no Estuário do Rio Ceará, em Fortaleza – CE. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**,v.36, n.2, p.135-142,2010.

FERREIRA, E.M. et al. Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p.49-54, 2014.

GACCHE, R.N.; SHAIKH, R.U.; PUND, M.M. *In vitro* evaluation of anticancer and antimicrobial activity of selected medicinal plants from Ayurveda. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v.6, n.3, p.127-133, 2011.

GRESVSKOTT, D.H. et al. Marine Bivalve Mollusks As Possible Indicators of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and Other Species of the Enterobacteriaceae Family. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-10, 2017.

JAFRI, S. A. et al. Antibiotic resistance of *E. coli* isolates from urine samples of Urinary Tract Infection (UTI) patients in Pakistan. **Bioinformation**, v. 10, n.7, p. 419-422, 2014.

JAGTAP, U.B.; BAPAT, V.A. Artocarpus: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, p.142-166, 2010.

JOSHI, A.; BHOBE, M.; SATTARKAR, A. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v5, n.7, p.80-87, 2013.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-16, 2013.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic indexing of *E. coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

LOIZZO, M.R. et al. Antioxidant and antibacterial on food borne 479 pathogens of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) leaves extracts. **Journal of Food Science**, v.75, n.5, p.291-295, 2010.

MACHADO, A.L. et al. Resistência Antimicrobiana em Cepas de *Escherichia coli* Isoladas de Pescado Marinho Comercializado na Feira Livre do Mucuripe - Fortaleza-CE, BRASIL. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 41, n.4, p.931 - 943, 2015.

MACHADO, S.R.; BARBOSA, S.B. **Manual de procedimentos- Herbário Botu**. São Paulo. 2010. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/Herbario/Manual_Herbario_BOTU.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2016.

MAFRA, J.F. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves processados e comercializados em Maragogipe, estado da Bahia, Brasil. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.4, n.2, p.39-43, 2016.

MEDEIROS, E.V. et al. Extrato Etanólico de *Senna alata* no Controle de *Myrothecium roridum*, Agente Causal do Cancro-de-Mirotécio. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 29, n. 3, p. 577-583, 2011.

MILUGO, T.K. et al. Antagonistic effect of alkaloids and saponins on bioactivity in the quinine tree (*Rauvolfia caffra* sond.): further evidence to support biotechnology in traditional medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n.285, p. 1-6, 2013.

NASCIMENTO, V. A. et al. Qualidade Microbiológica de Moluscos Bivalves - Sururu e Ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**, v.7, n.4, 2011.

NEILSON, E.H. et al. Plant chemical defense: at what cost?. **Trends in Plant Science**, v.18, n.5, 2013.

NEWELL, D.G. et al. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p.3-15, 2010

OBMEATA, O.; NNENNA, F-P.; CHRISTOPHER, N. Microbiological assessment of stored *Tilapia guineensis* **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 4, p. 242-247, 2011.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana**. Opoços de ação. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf>. Acesso em: 09 jun.2017.

PAIVA, P.M.G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Formatex Research**, p.396-406, 2010.

PROST, C. Resex marinha versus pólo naval da baía do Iguape. **Novos Cadernos NAEA**, v13, n.1, p. 47-70, 2010.

RAMOS, R.J. et al. Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.1, p.29-37, 2010.

RASHEED, M.U. et al. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. **Revista do Instituto de Medicina. Tropical**, Sao Paulo, v.56, n.4, p.341-346, July-August, 2014.

- ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections.**, v.6, p.22-29, 2015.
- RYU, S-H. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p.14–18, 2012.
- SAAD, S. et al. *In vitro* antimicrobial activity of mangrove plant *Sonneratia alba*. Asian Pacific **Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.6, p.427-429, 2012.
- SEPTAMA, A.W.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Antibacterial assay-guided isolation of active compounds from *Artocarpus heterophyllus* heartwoods. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.2, p.1608-1631, 2015.
- SILLEY, P. Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 31, n. 1, p. 33-41, 2012.
- SILVA, I.M.M. et al. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p. 333-339, 2011.
- SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**.3. ed. São Paulo: Livraria Varela; 2007.
- SIVAGNANASUNDARAM ,P.; KARUNANAYAKE, K.O.L.C. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus altilis* Leaf and Stem Bark Extracts. **OUSL Journal**, v.9, p.1-17, 2015.
- SZAKIEL, A.; PĄCZKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.10, p.471–491, 2011.
- SOARES, K.M.de. P.; GONÇALVES, A.A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.1, p.1-10, 2012.
- SOUZA, T.J.F.F.de. et al. Microrganismos de interesse sanitário em sushis. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo,v.74,n.3,p.274-9, 2015.
- VERNAZ, N. et al. Modelling the impact of antibiotic use on antibiotic-resistant *Escherichia coli* using population-based data from a large hospital and its surrounding community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 19, p. 1-8, 2011.

VERREAS, C. et al. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. **International Journal of Environmental. Research. and Public Health**, v.10, p.2643-2669, 2013.

WELLINGTON, E.M.H. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet**, v.13, p. 155-165, 2013.

CAPÍTULO 3

Presença de genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de sururu *Mytella guyanensis* comercializado

Presença de genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de sururu *Mytella guyanensis* comercializado

C. A. Barbosa ^{a*}, T. A. Conceição, M. D. B. Fernandes ^b, V. M.A. Camilo, P. J. L. Juiz ^c e I.M.M.Silva ^b

^a Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil

^b Centro de Ciências da Saúde Cajueiro, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB, Avenida Carlos Amaral, 1015, Cajueiro, CEP 44574-490, Santo Antônio de Jesus, BA, Brasil

^c Centro de Ciência e Tecnologia em Energia e Sustentabilidade, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB, Avenida Centenário, 697, Sim, CEP 44042-280, Feira de Santana, BA, Brasil

*e- mail: carlaalvesbarbosa@outlook.com.br

RESUMO

O isolamento de *Escherichia coli* a partir de alimentos é uma grande preocupação, pois cepas patogênicas desta bactéria podem causar desde diarreia até síndrome hemolítico-urêmica. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi pesquisar genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes do sururu *Mytella guyanensis* comercializado na cidade de Cachoeira, Bahia, Brasil. As amostras foram adquiridas de quatro comerciantes, sendo duas de mercados e duas em pontos de venda na feira livre da cidade de Cachoeira, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reutilizável e transportadas até o laboratório para a análise. Após a análise microbiológica, as cepas de *Escherichia coli* foram isoladas em ágar Eosina Azul de Metileno e preservadas em caldo Brian Heart Infusion e glicerol a 15 % e mantidas a - 20° C. A identificação dos genes de virulência nas cepas isoladas foi realizada utilizando *primers* específicos por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. Foram obtidos 24 isolados

de *Escherichia coli*, destes a prevalência do gene *elt*, característico de *Escherichia coli* enterotoxigênica, foi de 75 % dos isolados. Não houve a detecção dos genes *stx* e *bfpA* nos isolados, os quais são prevalentes nas cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica e *Escherichia coli* enteropatogênica, respectivamente. A presença do gene *elt* relacionado à virulência de *Escherichia coli* nos isolados de *Mytella guyanensis* revela a necessidade da melhoria no processamento, incluindo boas práticas de manipulação, armazenamento adequado e cocção previa ao consumo, visando a garantia da saúde do consumidor.

Palavras-chave: Molusco bivalve. Coliforme termotolerante. Virulência. PCR.

ABSTRACT

Isolation of *Escherichia coli* from food is a major concern, as pathogenic strains of these bacteria can cause from diarrhea to hemolytic-uremic syndrome. In light of this, this study aimed to investigate virulence genes in *Escherichia coli* isolates from mussel (*Mytella guyanensis*) commercialized in Cachoeira, Bahia, Brazil. The samples were purchased from four merchants, two from markets and two at points of sale in the free market of the city of Cachoeira, packaged in isothermal boxes with reusable ice and transported to the laboratory for analysis. After microbiological analysis, *Escherichia coli* strains were isolated in eosin methylene blue agar, preserved in brain-heart infusion medium and 15 % glycerol and stored at - 20°C. Identification of the virulence genes in the isolated strains was performed using specific primers by means of the Polymerase Chain Reaction. Twenty-four *Escherichia coli* isolates were obtained, in which there was a prevalence of the *elt* gene, typical from enterotoxigenic *Escherichia coli*, in 75 % of the isolates. No *stx* and *bfpA* genes, prevalents in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*, respectively, were found. Presence of *elt* virulence related gene in *Escherichia coli* in *Mytella guyanensis* isolates reveals the need for improvement in food processing, including good handling practices, adequate storage and cooking before consumption, in order to ensure consumer's health.

Keywords: Bivalve mollusc. Thermotolerant coliforms. Virulence. PCR.

Introdução

Escherichia coli é uma bactéria que pode ser comensal ou causar uma diversidade de infecções em humanos e animais (Backer, 2014). As cepas de *E. coli* que causam infecções intestinais são chamadas de diarreogênicas e divididas em seis patótipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Croxen e Finlay, 2010).

Para desencadear a infecção, as bactérias possuem diferentes fatores de virulência, tais como toxinas e mecanismos de adesão as células (Croxen e Finlay, 2010; Chandra et al. 2013). Dentre as toxinas destacam-se a toxina Shiga (STX) produzida por EHEC (Obrig, 2010) e codificada pelo gene *stx* (Mauro e Kouldelka, 2011) as toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) produzidas por ETEC (Begum et al. 2014) e codificadas pelos genes *elt* e *est*, respectivamente (Manzoor et al. 2015) e os mecanismos de aderência das bactérias as células que estão associados a EPEC (Mainil e Daube, 2005), como o *bundle-forming pilus* (BFP) tipo IV que tem sua principal subunidade estrutural codificada pelo gene *bfpA* (Contreras et al. 2010; Teixeira et al. 2015).

Tendo em vista os danos que cepas patogênicas de *E. coli* podem causar, existe uma grande preocupação com a presença de estirpes desse microrganismo em alimentos, tais como o pescado (Costa, 2013). De acordo com Zhao et al. (2014) existe uma alta prevalência de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados em países em desenvolvimento e a detecção dos agentes contaminantes é uma etapa importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção. Um método bastante utilizado para detecção de patógenos humanos que são veiculados pelo consumo de alimentos contaminados é a Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR), essa técnica é baseada na amplificação de regiões específicas do DNA utilizando *primers* específicos e apresenta alta sensibilidade.

Estudos com o objetivo de caracterizar genotipicamente isolados bacterianos presentes no sururu *Mytella guyanensis* comercializado são escassos, desta forma, este trabalho visa pesquisar genes de virulência em isolados de *E. coli* provenientes de sururu *M. guyanensis* comercializado na cidade de Cachoeira, Bahia, Brasil.

Material e métodos

Amostragem

As amostras de *M. guyanensis* foram adquiridas de quatro comerciantes de Cachoeira (Bahia), sendo dois pontos de venda oriundos da feira livre e dois de mercados, no período de dezembro de 2015 a janeiro de 2016. Foi comprado um quilo de sururu de cada comerciante. As amostras (1kg) foram acondicionadas em sacos plásticos de primeiro uso, devidamente identificadas e transportadas em refrigeração para o Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Segurança Alimentar e Nutricional do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Santo Antônio de Jesus, sendo imediatamente analisadas.

Isolamento das cepas

As populações de *E. coli* foram estimadas pelo método de contagem rápida petrifilm™ (3M Company), utilizando placas EC (AOAC 998.08). De cada amostra foram retirados 25 g e adicionados em 225 mL de solução salina a 0,9 % de NaCl. Esta mistura foi homogeneizada em *stomacher* por 30 segundos e diluídas em série (10^{-2} e 10^{-3}). As amostras foram plaqueadas e incubadas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por $24 \pm 2\text{h}$ (Silva et al. 2007).

Purificação das cepas

Colônias características de *E. coli* (azuis com bolhas de gás) foram retiradas com uma alça de platina e repicadas em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) Kasvi® e incubadas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por $24 \pm 2\text{h}$. Uma colônia característica (negra com brilho verde metálico) isolada de cada

placa foi transferida para Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) Kasvi® e incubada a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 h (SILVA et al., 2007). Os 24 isolados foram preservados com glicerol a 15 % conservados a -20°C (SILVA et al. 2011).

Extração de DNA e Técnica de PCR

A extração de DNA e técnica de PCR foram realizadas de acordo com metodologia adaptada de Silva et al. (2011), assim, realizou-se a padronização previa dos testes de PCR para os genes em estudo, cujo melhor desempenho foi alcançado conforme descrito na tabela 1. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Amplitherm® TX96 Plus conforme condições descritas na tabela 2.

Tabela 1 - Componentes utilizados para a amplificação dos genes *stx*, *elt* e *bfpA* na Reação em Cadeia da Polimerase

Componentes	Volume <i>stx</i> e <i>elt</i>	Concentração Final <i>stx</i> e <i>elt</i>	Volume <i>bfpA</i>	Concentração Final <i>bfpA</i>
Água miliQ estéril	15,2 μL	-	16,05 μL	-
10XPcr buffer	5 μL	2X	2,5 μL	1X
10 mM dNTP mix	0,5 μL	0,2mM	0,5 μL	0,2mM
50 mM MgCl ₂	1,5 μL	3Mm	0,75 μL	1,5mM
Iniciador direto	0,8 μL	0,8pmol	1 μL	1pmol
Iniciador reverso	0,8 μL	0,8pmol	1 μL	1pmol
Taq DNA polimerase	0,2 μL	2U	0,2 μL	2U
DNA molde	1 μL	-	3 μL	-
	25 μL	-	25 μL	-

Tabela 2. Sequência de *primers*, tamanho do fragmento amplificado e condições para a Reação em Cadeia da Polimerase

Gene/sorotipo	Sequência de primer 5´- 3´	Tamanho do fragmento (pb)	Condições da PCR
<i>stx</i> /EHEC	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	227	5 min 94°C/35 ciclos de 1 min 94°C, 3 min 48°C e 4 min 72°C/10 min 72°C
<i>elt</i> /ETEC	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	696	5 min 94°C/30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 56°C e 1 min 72°C /10 min 72°C
<i>bfpA</i> /EPEC	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	330	5 min 94°C/29 ciclos de 30 seg 94°C, 1 min 56°C e 2 min 72°C/10 min 72°C

Fonte: Silva et al., 2011

Os produtos da PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2 % em sistema de eletroforese horizontal para a visualização das bandas, utilizando como marcador de tamanho o peso molecular de 50pb. A corrida por eletroforese foi realizada com fonte digital GSR® 200STD considerando os seguintes parâmetros, previamente padronizados: 80V, 80min, 200mA para os genes *stx* e *elt* e 70v, 100min, 200mA para o gene *bfpA*. Utilizou-se o corante de corrida Loading Dye 6X Promega® juntamente com SYBR Green Life Technologies® para visualização dos produtos de PCR em fotodocumentador ultravioleta Loccus L-PIX.

Resultados

Os resultados mostraram amplificação do gene *elt* característico de ETEC, em 75% dos isolados de *E.coli*. Destes, 50% foram provenientes das amostras isoladas de sururu coletados em mercados e 50% provenientes das amostras de sururu coletadas em pontos de venda da feira livre. Não foi observada a amplificação de bandas dos genes *stx* e *bfpA*, característicos de cepas de EHEC e EPEC, respectivamente.

Discussão

A presença de *E.coli* em pescado tem uma relação com a qualidade higiênico-sanitária dos mesmos, uma vez que essa bactéria indica contaminação fecal (Dutta et al. 2015). Em alguns alimentos podem estar presentes cepas patogênicas dessa bactéria, como demonstrado no presente estudo pela expressão do gene *elt*, característico de ETEC.

Kambire et al. (2017) realizaram estudo para a detecção de patótipos de *E.coli* em amostras de água, sedimento, peixe e caranguejo, detectaram ETEC como o patótipo mais prevalente nas amostras de água, sedimentos e caranguejo.

De acordo com Anand et al. (2016) ETEC é um patótipo que causa diarreia pela liberação de enterotoxinas potentes. Uma delas é a LT que é codificada pelo gene *elt*. Shahrokhi et al. (2011) mostraram em estudo que a produção de LT e ST em cepas de ETEC está equiparada, porém algumas cepas podem produzir apenas uma das enterotoxinas.

Para Johnson et al.(2009) a produção de LT auxilia na colonização das células do hospedeiro. As interações de LT com a célula hospedeira resulta na ativação constitutiva de adenilato ciclase e produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), a elevação intracelular deste componente leva a ativação da proteína quinase A dependente de AMPc, esta fosforila o domínio R do regulador de condutância transmembranar da fibrose cística. A entrada de cloreto e efluxo de água na luz intestinal levam a diarreia aquosa. Dubreuil et al. (2016) relatam que LT utiliza os componentes da célula para exercer seu efeito tóxico.

Cepas patogênicas de *E. coli* representam uma grande preocupação para a saúde pública, sobretudo por seu grande potencial de disseminação em diferentes fontes, sendo os alimentos um importante veículo desse microrganismo (Croxen et al. 2013). Isso infere um grande risco pelo consumo de alimentos crus ou parcialmente coccionados, como é usualmente consumido *Mytella guyanensis* (Santiago et al. 2013). Tendo em vista que a LT de ETEC pode ser inativada com o aquecimento a 60 °C por 10 min (Takeda, 2011), o consumo desses alimentos

coccionados é fundamental. Para Santos et al. (2014) esse tratamento é indispensável para a garantia das condições sanitárias do produto final.

Carvalho et al. (2016) mostraram que a detecção de bactérias patogênicas em pescado é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que garantam a qualidade destes para os consumidores.

A presença de genes relacionados à virulência de *E.coli*, nos isolados de *M. guyanensis* revela a necessidade da melhoria no processamento, incluindo boas práticas de manipulação, armazenamento adequado e cocção previa ao consumo, visando a garantia da saúde do consumidor, tendo em vista que a cocção mantém a qualidade microbiológica do alimento e pode inativar a toxina termolábil de ETEC.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Referências

ANAND, S, MANDAL, S, PATIL, P e TOMAR, S.K., 2016. Pathogen-induced secretory diarrhea and its prevention. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 35, no.11, pp. 1721–1739. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-27473379>
PMId:27473379.

BACKER, KS, 2014. Demystifying *Escherichia coli* pathovars. *Nature Reviews Microbiology*, vol.13, pp.1.

BEGUM, Y.A, BABY, N.I, FARUQUE, A.S, JAHAN, N, CRAVIOTO, A, SVENNERHOLM, A.M e QADRI F., 2014. Shift in Phenotypic Characteristics of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Isolated from Diarrheal Patients in Bangladesh. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.8, no. 7, pp.e3031. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003031>.

CARVALHO, M.C.N, JAYME, M.M, ARENAZIO, G.S, ARAÚJO, F.V, LEITE, S.G.F e DEL- AGUILA, A.M., 2016. Microbiological Quality Assessment by PCR and Its Antibiotic Susceptibility in Mangrove Crabs (*Ucides cordatus*) from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, *Brazilian International Journal of Microbiology*, vol.2016, pp.:1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7825031> .

CHANDRA, M, CHENG C, P, RONDEAUB, G, PORWOLLIKC, S e MCCLELLANDB, M., 2013. A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, vol.303, no.4, pp.210–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.013> .PMId:23562277.

CONTRERAS, C.A, OCHOA, T.J, LACHER, D.W, DEBROY, C, NAVARRO, A, TALLEDO, M, DONNENBERG,M.S, ECKER, L, GIL, A.I, LANATA, C.F e Cleary, T.G., 2010. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *Journal of Medical Microbiology*, vol.59, no.1, pp.25-31. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.013706-0>. PMId:19797469.

COSTA, R.A., 2013. *Escherichia coli* in seafood: A brief overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, vol.4, no.3A, pp.450-454. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.43A060>.

CROXEN, M.A e FINLAY, B.B.,2010.Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 1, pp.26 38. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2265> . PMId: 19966814.

CROXEN, M.A, LAW, R.J, SCOLZ, R, KEENEY,K.M, WLODARSKA, M e Finlay, B.B., 2013.Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.26, no. 4,pp.:822-880. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00022-13> . PMId: 24092857.

DURBREUIL, J.D, ISAACSON, R.E e SCHIFFERLI, D.M.,2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, vol.7, no.1, pp.1-47. <http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016> PMID:27735786.

DUTTA, C, PANIGRAHI, A.K e SENGUPTA, C.,2015.Prevalence of Pathogenic Bacteria in Finfish and Shellfish Obtained from Domestic Markets of West Bengal, India. *Frontiers in Environmental Microbiology*, vol. 1, no.2, pp.14-18. <http://dx.doi.org/10.11648/j.fem.20150102.11> .

JOHNSON, A.M, KAUSHIK, R.S, FRANCIS, D.H, FLECKENSTEIN, J.M e HARDWIDGE, P.R., 2009. Heat-Labile Enterotoxin Promotes *Escherichia coli* Adherence to Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Bacteriology*, vol.191, no.1,pp.178-186. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00822-08> .PMId:18978047.

KAMBIRE ,M.A, ADINGRA, A.A, YAO, K.M, KOFFI-NEVRY, R., 2017.Prevalence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes of *Escherichia coli* Isolates from Water, Sediment, Fish, and Crab in Aby Lagoon, Côte d'Ivoire. *International Journal of Microbiology*, vol. 2017,no.2017, pp.1-9. <https://doi.org/10.1155/2017/9532170> . PMID: 28676828.

MAINIL, J.G e DAUBE, G.,2005.*Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who?.*Journal of Applied Microbiology*, vol. 98, no. 6, pp.1332–1344. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02653.x>. PMID:15916647.

MAURO, A.S e KOULDELKA, G.B., 2011. Shiga Toxin: Expression, Distribution, and Its Role in the Environment.*Toxins*, vol.3, no.6, pp.608-625. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins3060608>.

MANZOOR, R, SHAH, M.I, UL-USNA, A, WANI, S.A, PANDIT, F, DAR, P.A e MIR, M.I., 2015.Prevalence, serodiversity and antibiogram of enterotoxigenic *Escherichia coli*

(ETEC) in diarrhoeic calves and lambs of Kashmir valley (J&K), India. *Journal Applied & Natural Science*, vol. 7, no.1, pp.477-481.

OBRIG,T.G., 2010..*Escherichia coli* Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease. *Toxins*, vol,2, no.12, pp.2769-2794. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins2122769>.

SANTIAGO, J.A.S., ARAÚJO,,P.F.R, SANTIAGO, A.P, CARCVALHO, F.C.T e Vieira R.H.S.F.,2013.Bactérias Patogênicas Relacionadas à Ingestão de Pescados- Revisão. *Arquivos de Ciências do Mar*, vol. 46, no.2,pp.:92-103.

SANTOS, T.M.M, SAWAYA, A.L, SILVA, M.C.D, SANTOS, A.F, BARROS-NETO,J.Á e FLORÊNCIO, T.M.M.T.,2014.Avaliação microbiológica e da concentração de vitamina A, ferro e zinco em preparações do molusco sururu (*Mytella falcata*). *Demetra Alimentação, Nutrição & Saúde*, vol.9, no.3, pp.811-822.<http://dx.doi.org/10.12957/demetra.2014.9440>.

SHAHROKHI, N, BOUZARI, S e JAFARI, A., 2011.Comparison of virulence markers and antibiotic resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated ten years apart in Tehran.*Journal of Infection Developing Countries.*, vol.5, no.4, pp.248-54. <https://doi.org/10.3855/jidc.1206>. PMID: 21537065.

SILVA, I.M.M, EVÊNCIO-NETO, J, SILVA, R.M, LUCENA-SILVA, N, MAGALHÃES J e BALIZA, M., 2011.Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 63, pp.333-339. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000200010> .

SILVA, N, JUNQUEIRA, V.C.A, SILVEIRA, N.F.A, TANIWAKI, M.H, SANTOS, R.F.S e GOMES, R.A.R.,2007.*Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. 3 ed. São Paulo:Varela.

TAKEDA, Y., 2011.*Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*.*Proceedings of the Japan*

Academy.Series B, Physical and Biological Sciences, vol. 87, no.1, pp.1-12.

<http://dx.doi.org/10.2183/pjab.87.1>.PMId:21233598.

TEIXEIRA, N.B, ROJAS, T.C, SILVEIRA, W.D, MATHEUS-GUIMARÃES, C, SILVA, N.P e SCALETISKY, I.C., 2015.Genetic analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor (EAF) plasmid reveals a new deletion within the EAF probe sequence among O119 typical EPEC strains. *BMC Microbiology*, vol.15, pp.1-9.

<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0539-9>.

ZHAO, X, LIN, C.W, WANG, J e OH, D.H., 2014. Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol.24, no.3,pp.297–312.

<http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>. PMId:24375418.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Determinar a qualidade higiênico-sanitária de moluscos bivalves, como *M. guyanensis*, é fundamental, tendo em vista o seu hábito de animal filtrador capaz de reter microrganismos do ambiente. Esse molusco passa por um processo de beneficiamento que nem sempre é eficaz para garantia da qualidade microbiológica, também pode ser contaminado durante o processo de beneficiamento pela manipulação inadequada.

A presença de *E. coli* em alimentos indica contaminação fecal. A presença de genes de virulência em isolados de *E. coli* provenientes de *M. guyanensis* mostra que os microrganismos presentes nesse alimento podem ser capazes de desenvolver infecções graves, já que se trata de um gene associado a uma enterotoxina potente de ETEC, sendo as características da doença diarreia aquosa que leva a desidratação, em populações mais vulneráveis como crianças esse tipo de infecção pode ser fatal. A detecção de *E. coli* resistente a antimicrobianos nesse alimento é um indicativo que da necessidade do beneficiamento correto deste molusco, visando evitar a disseminação dessas bactérias comunidade.

O uso de extratos de plantas como antimicrobianos tem sido relatado na literatura pela presença de metabólitos secundários que garantem o efeito biológico desses. Apesar dos extratos de *A. heterophyllus* não terem apresentado atividade contra as cepas de *E.coli* testadas, sua atividade antimicrobiana não pode ser descartada, uma vez que foi detectada a presença de metabólitos secundários. Essa falta de atividade pode estar relacionada a fatores como: época de coleta, horário da coleta, extração ou mesmo a quantidade insuficiente de compostos biativos nos extratos.

São necessárias ações que assegurem a qualidade microbiológica do sururu *M. guyanensis* comercializado em Cachoeira, para diminuir a contaminação por *E. coli* nesse alimento e os riscos do desenvolvimento de DTA nos consumidores.