



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

**Atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana* L.
(urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes.**

Cláudia Majolo

Porto Alegre, Brasil
Novembro, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

Cláudia Majolo
(Química Industrial – UNIVATES)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientadora: Dra. Heloísa Helena Chaves
Carvalho

Porto Alegre, Brasil
Novembro, 2009

Cláudia Majolo
(Bacharel em Química Industrial – UNIVATES)

DISSERTAÇÃO

**Atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana* L.
(urucum), e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes.**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:...../...../.....

Pela Comissão Organizadora:

Prof. Dr. José Maria Wiest
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Homologada em/...../.....

Por:

Dra. Heloisa Helena Chaves Carvalho
Co-orientadora – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. José Maria Wiest
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

Prof. Dra. Ingrid B. Inchausti de Barros
Faculdade de Agronomia/UFRGS

Prof. Dra. Isa Beatriz Noll
PPGCTA/UFRGS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. CTA/UFRGS

Prof. Dr. Hans Fröder
Centro Universitário UNIVATES

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todas as oportunidades a mim oferecidas.

Ao professor e “pai” Prof. José Maria Wiest pela dedicação e oportunidade de aprendizagem, crescimento profissional e pessoal, meus especiais agradecimentos.

A colega e amiga Heloísa Helena Chaves Carvalho pelo apoio e dedicação quanto às fundamentais orientações para o desenvolvimento deste trabalho.

Também aos colegas de trabalho do Laboratório de Higiene de Alimentos Giuliana, Carin, Simone, Felícia, Marcelo, Camila, Mariana e Mônica, pelo apoio e amizade.

À Bióloga Silvia Marodin pela identificação botânica dos acessos de urucum.

Aos colegas de trabalho da UNIVATES pelo apoio e suporte em minhas ausências.

À minha inesquecível Tuca pelos ensinamentos profissionais e de vida que, com certeza, ficarão eternamente gravados em meu coração.

Meus agradecimentos à minha família: Ivar, Marisa, Cristine e Lucas, que entenderam minhas ausências, angústias e irritações, sempre me apoiando e incentivando.

E a ti Alexandre, pelo teu apoio, amor e compreensão (quantas madrugadas me levando até a rodoviária, né?), para a concretização deste sonho.

*Dedico este trabalho com muito amor,
carinho e gratidão aos meus queridos avós
Alípio, Irena, Reno e Adélia.*

Título: Atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes.

Autora: Cláudia Majolo

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientador: Dra. Heloísa Helena Chaves Carvalho

RESUMO

Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia) de soluções contendo extratos hidroetanólicos e hídricos (decocto e infuso) de três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) a saber: Arroio do Meio/RS, Eldorado do Sul/RS e Maringá/PR, sobre inóculos padronizados de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114). Determinou-se, paralelamente, o teor de bixina presente nas sementes. Os extratos hídricos apresentaram baixa atividade de inibição e/ou inativação sobre os inóculos bacterianos, enquanto que a forma de extração hidroetanólica apresentou atividade antibacteriana seletiva e significativamente mais intensa (inibição/inativação) entre as cinco bactérias testadas. Independente da forma de extração, as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* foram as mais sensíveis à atividade antibacteriana, enquanto que *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade. Houve diferença significativa entre os teores de bixina dos três acessos, e, conseqüentemente, a atividade antibacteriana determinada mostrou-se diretamente proporcional a estes teores.

Palavras-chave: *Bixa orellana*, atividade antibacteriana, inibição bacteriana, inativação bacteriana, bixina.

ABSTRACT

Antibacterial activity *in vitro* of different accessions of *Bixa orellana* L. (annatto) and its relationship with the content of bixin present in seeds.

Through of Dilution Tests in Multiple Tubes System it was determined the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/bacteriostasy) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/bactericidie) from solutions containing hidroetanolic and hydric (decoction and infusion) extracts of tree accesses from *Bixa orellana* L. (annatto) at know: Arroio do Meio/RS, Eldorado do Sul/RS and Maringá/PR, on standardized inocula of *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114). It was determined, in parallel, the content of bixin present in the three different accesses of the seeds. The forms of hydric extraction showed low inhibition and/or inactivation activity of the bacterial inocula, and the hidroetanolic extract form showed selective antibacterial activity and significantly pronounced inhibition/inactivation against the five bacteria tested. Independent of the extraction forms, *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes* were the more sensitive agents to the antibacterial activity. *Escherichia coli* had the lowest sensitivity to all forms of extraction. The bixin contents were significantly different between the accesses and, consequently, the antibacterial activity was directly proportional to this contents.

Key words: *Bixa orellana*, antibacterial activity, bacterial inhibition, bacterial inactivation, bixin.

LISTA DE QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS

Capítulo 3

Quadro 1 - Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.....30

Tabela 1 - Análise da sensibilidade de cinco espécies bacterianas de interesse em alimentos frente às soluções conservantes de três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.....32

Tabela 2 - Análise da relação entre espécies bacterianas de interesse em alimentos e diferentes tipos de extração de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos e tipo de acesso.....33

Tabela 3 - Análise da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas e por hidroalcoolatura.....34

Tabela 4 - Análise da relação entre os diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e teor de bixina presente nas sementes, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos e da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana*36

Capítulo 4

Gráfico 1 - Análise da sensibilidade de cinco espécies bacterianas de interesse em alimentos frente às soluções conservantes três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.....42

Gráfico 2 - Análise da relação entre espécies bacterianas de interesse em alimentos e diferentes tipos de extração de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos e tipo de acesso.....43

Gráfico 3 - Análise da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas e extração hidroetanólica (Acesso Arroio do Meio/RS).....44

Gráfico 4 - Análise da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas e extração hidroetanólica (Acesso Eldorado do Sul/RS).....44

Gráfico 5 - Análise da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas e extração hidroetanólica (Acesso Maringá/PR).....44

Gráfico 6 - Análise da relação entre os diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e o teor de bixina presente nas sementes, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos e da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum).....46

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 | 11 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.2 OBJETIVO GERAL | 13 |
| CAPÍTULO 2 | 14 |
| 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| CAPÍTULO 3 | 21 |
| Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de diferentes acessos de <i>Bixa orellana</i> L. (urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes..... | 22 |
| INTRODUÇÃO | 24 |
| MATERIAL E MÉTODO | 26 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| CAPÍTULO 4 | 41 |
| 4 REAPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS..... | 42 |
| 4.1 Sensibilidade bacteriana | 42 |
| 4.2 Eficácia da atividade antibacteriana dos diferentes tipos de extração | 42 |
| 4.3 Presença ou ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana .. | 43 |
| | 43 |
| 4.4 Atividade antibacteriana x Teor de bixina nas sementes | 45 |
| REFERÊNCIAS GERAIS | 47 |
| APÊNDICES..... | 53 |

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos.

1.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das maiores preocupações para evitar a contaminação microbiana por parte da indústria de alimentos é com relação ao uso de preservantes químicos, que podem, muitas vezes, ser substituídos por alternativas naturais, menos prejudiciais à saúde e, muitas vezes, mais viáveis economicamente (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008).

As dificuldades enfrentadas pela segurança alimentar baseiam-se na diversidade de consumidores, com diferentes graus de sensibilidade e estilos de vida. Além disso, alimentos com altos níveis de conservantes, para redução da carga microbiana, são indesejáveis. A pressão por parte dos consumidores se volta para uma produção maior de alimentos frescos, que possuam conservantes naturais e com uma maior garantia de segurança (FORSYTHE, 2002).

O uso de aditivos alimentares que aumentam a segurança microbiológica é de grande interesse para a indústria de alimentos, entretanto, o uso inadequado de antibióticos faz com que microrganismos patogênicos apresentem resistência a medicamentos, havendo a necessidade de novos antimicrobianos de fontes naturais (SARTORATTO *et al.*, 2004).

Pertencente à família *Bixaceae*, a espécie *Bixa orellana* L. é popularmente conhecida como urucu, urucum, urucuzeiro, açafrão, açafroa, açafroa-da-bahia, açafroa-do-brasil, açafroa-indígena, açafroeira-da-terra, anoto, colorau, falso-açafrão, orucu, urucuuba e uru-uva. Além de corante natural na culinária, sua utilização na medicina popular é bem pronunciada, principalmente para doenças coronarianas, afecções do estômago e intestino, afecções respiratórias, queimaduras e como afrodisíaco (LORENZI & MATOS, 2002).

O uso do *Bixa orellana* L. (urucum) é muito pronunciado em diversos setores industriais em substituição a muitos corantes sintéticos, devido a sua baixa toxicidade e baixo custo de produção, tornando-o conveniente e atrativo (AGNER *et al.*, 2004).

Estudos com *Bixa orellana* L. (urucum) relatam sua atividade antimicrobiana, demonstrando a capacidade preservativa desta planta na conservação e agregação de qualidade aos alimentos (BRAGA *et al.*, 2007; ROJAS *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2005; NALIMOVA *et al.*, 2005; FLEISCHER *et al.*, 2003; IROBI, 1996;).

1.2 OBJETIVO GERAL

Fundamentar o desenvolvimento de alimentos seguros, pelo uso de *Bixa orellana* L. (urucum) como conservante antibacteriano e condimento natural.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade bacteriostática/inibição e bactericida/inativação *in vitro* de soluções conservantes contendo extratos hidroetanólicos e hídricos (decocto e infuso) obtidos de diferentes acessos (Arroio do Meio/RS, Eldorado do Sul/RS e Maringá/PR) de sementes de *Bixa orellana* L. (urucum), através de testes de diluição em sistema de tubos múltiplos, sobre os seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis;
- Avaliar a relação entre o teor de bixina presente nas sementes com o poder antibacteriano proveniente dos diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum).

CAPÍTULO 2

Revisão bibliográfica.

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Plantas condimentares-medicinais

As plantas condimentares, conhecidas como especiarias, são usadas em alimentos, porém, após identificadas suas atividades antimicrobianas, podem também ser usadas como conservantes em alimentos (AURELI, 1992).

Hammer et al. (1999) através de estudos *in vitro* demonstrou atividade antibacteriana e antifúngica de 52 óleos essenciais e extratos de diversas plantas sobre *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*, observando uma maior inibição provocada pelo óleo de orégano, entre todos os óleos testados.

Carvalho et al. (2005) atribuem intensa e seletiva atividade antimicrobiana de diferentes extratos de plantas com indicativo condimentar na região metropolitana de Porto Alegre/RS sobre diferentes padrões bacterianos testados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis*, sendo que as plantas que mais se destacaram foram sálvia (*Salvia officinalis* Linn.), alho porró (*Alium porrum* Linn.), alho nirá (*Alium tuberosum* Rotti.) e pimentas ornamentais (*Capsicum annuum* Linn), malagueta (*Capsicum frutescens* Linn.), calabresa (“pool” de *Capsicum sp.*) e dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* Linn.), o que poderia integrar-se a ações de saúde indicadas na prevenção e controle de surtos de toxinfecções alimentares.

Segundo Haida et al. (2007), a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais, tem se mostrado bastante expressiva nos últimos anos, visando solucionar os problemas da resistência microbiana a antibióticos atualmente utilizados.

O problema de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos começou a ser discutido na década de 70, quando médicos foram forçados a abandonar suas convicções de que, com a ampla oferta de agentes antimicrobianos existente, todas infecções bacterianas eram tratáveis (LOWY, 2003). Fato este, abalado com o aparecimento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes. Dados relativos a múltiplas resistências bacterianas, tem assustado cada vez mais,

especialistas e população, tendo demonstrado que as bactérias possuem e desenvolvem mecanismos muito complexos para garantir sua sobrevivência e multiplicação no ambiente e nos hospedeiros.

Numerosas manifestações conforme relatado por Livermore (2007), demonstram e justificam a necessidade de diminuir o uso de antimicrobianos em geral, conduzindo o uso dos mesmos da forma mais correta possível e adotando-se, cada vez mais, medidas profiláticas eficazes.

2.1.2 *Bixa orellana* L. (urucum)

Bixa orellana L. (urucum) é uma árvore pequena, originária da América tropical, incluindo a Amazônia brasileira, com no máximo cinco metros de altura e de copa bem desenvolvida. As folhas são simples, glabras, medindo de oito a onze centímetros de comprimento. Suas flores são levemente rosas e o fruto é uma cápsula deiscente ovóide, com dois a três carpelos, cobertos por espinhos. Nas sementes encontra-se um óleo essencial rico em all-E-geraniolgeraniol, monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, além dos carotenóides bixina e norbixina e em menor quantidade, alfa e beta-caroteno (LORENZI & MATOS, 2002).

Segundo Coelho (2003) as tinturas de *Bixa orellana* apresentam em sua composição saponinas, flavonoides, taninos, alcalóides e esteróides

O nome popular da *Bixa orellana* L. (urucum) tem origem na palavra tupi “uruku”, que significa “vermelho”. Das sementes do urucum, tribos indígenas brasileiras e peruanas extraem um pigmento vermelho usado como corante e protetor de pele e repelente de insetos. Hoje, no Brasil, há cerca de seis mil hectares de plantações de urucum, deixando no passado remoto a coleta selvagem, substituída hoje, pela profissionalização do cultivo (BARBOSA FILHO, 2006).

Urucum é uma especiaria constituída de semente, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor e aroma aos alimentos e bebidas (BRASIL, 2005).

Em 2002, Paumgarten e colaboradores, avaliaram a toxicidade de extratos de urucum (28% de bixina) em ratas. Doses de até 500 ppm de massa corpórea/dia foram introduzidas diretamente no estômago destes animais. Os resultados demonstraram, que não houve efeito adverso, tanto nas mães quanto nos fetos. Os extratos de urucum não introduziram aumento na incidência de anomalias externas

visíveis, viscerais ou do esqueleto dos fetos, sugerindo assim, que os extratos de urucum não se mostraram tóxicos para as ratas, nem embriotóxicos.

A Comissão do JECFA estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de bixina de 0 a 12mg/Kg de peso corpóreo (JECFA, 2007).

Um extrato orgânico (etanólico 95%) de folhas de *Bixa orellana* L. (urucum), apresentou significativa ação antibacteriana, principalmente frente à bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*) (IROBI, 1996). Já, para Gonçalves (2005), o extrato hidro-alcoólico de *Bixa orellana* L. (urucum) apresentou atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*, confirmando o seu uso na terapêutica popular.

2.1.3 Microrganismos

2.1.3.1 *Escherichia coli*

Membro da família das enterobactérias a *Escherichia coli* é um gênero bacteriano de apenas uma espécie e, aproximadamente 100 tipos antigênicos, sendo os sorotipos definidos com base nos antígenos: somáticos O; flagelares H; e capsulares K (GERMANO *et al.*, 2008).

Em 1885, durante a tentativa de isolamento do agente etiológico da cólera, Escherich, médico austríaco, isolou e estudou um microrganismo que agora é chamado de *Escherichia coli*. Inicialmente, esse microrganismo foi denominado *Bacterium coli commune* devido à sua presença nas diarreias de todos os pacientes examinados. Schardinger foi o primeiro a sugerir o uso desse microrganismo como um indicador de poluição fecal. O teste para mensurar a potabilidade da água foi sugerido por T. Schmith, em 1895, e marcou o início do uso dos coliformes como indicadores de patógenos em águas, uma prática que foi estendida posteriormente aos alimentos (JAY *et al.*, 2005).

Durante o século XX, a indústria de alimentos considerou a *Escherichia coli*, um microrganismo indicador de qualidade higiênico sanitária. Porém nas últimas décadas, comprovou-se que muitos sorotipos desta bactéria eram altamente patogênicos para o homem e podiam provocar graves infecções. Isto ocorreu devido ao aprofundamento de estudos de tipagens de *Escherichia coli* associadas a

quadros clínicos de colite hemorrágica, disenteria, cistite, nefrite, infecções de feridas cirúrgicas, septicemia e, especialmente da síndrome urêmica-hemolítica (HUS) (GERMANO *et al.*, 2008).

2.1.3.2 *Enterococcus*

Enterococcus são bactérias Gram-positivas definidas como bactérias lácticas. São usadas como indicadores de contaminação fecal, reportados em surtos de doença alimentar, como graves infecções do trato urinário entre outras, em função de resistências a antibióticos, e responsáveis por estragar carnes processadas. Entretanto, possuem aspectos benéficos como, por exemplo, desempenhar o amadurecimento e aroma de certos queijos e embutidos, produção de bacteriocinas anti-*Listeria* e podem ser usados como probióticos e para tratamentos de gastroenterites em humanos e animais (FRANZ *et al.*, 2003; FRANZ *et al.*, 1999).

O principal reservatório de *Enterococcus* são os humanos, que por sua vez, podem contaminar úberes de animais através da ordenha ou por contaminações no próprio leite, por isso, a importância da pasteurização do leite antes do consumo. E assim, os locais de maior incidência de surtos são os países de terceiro mundo, onde o consumo de leite *in natura* ainda é muito pronunciado (ACHA & SZYFRES, 2003).

2.1.3.3 *Staphylococcus*

Staphylococcus são bactérias gram-positivas em forma de cocos, agrupadas em forma de cachos. A bactéria é pouco resistente ao calor, entretanto produz enterotoxinas (A, B, C, D e E) que são termorresistentes. Atualmente, é uma das mais importantes causas de intoxicação alimentar, sendo que o principal reservatório de *Staphylococcus* é o homem, principalmente na região nasofaringeana e na pele, contaminando desta forma os alimentos por contato ou através de doenças respiratórias. Muitos surtos de infecção estafilocócica ocorrem devido a ingestão de *in natura* ou de queijos, isto porque muitas vezes, o leite procede de úberes de vacas com infecções estafilocócicas. Um dos maiores surtos ocorreu na Califórnia, onde 500 alunos ingeriram leite achocolatado (ACHA & SZYFRES, 2003).

Staphylococcus são uma das principais causas de um amplo e diversificado número de doenças como: síndrome do choque tóxico, febres e intoxicações

alimentares, acreditando-se que, estas doenças, na maioria, são causadas por toxinas liberadas por estes microrganismos nos alimentos (WILLIAM *et al.*, 2000).

2.1.3.4 *Salmonella*

Pertencente a família das enterobactérias, são constituídas de bacilos Gram-negativos, móveis (com poucas exceções), anaeróbios facultativos, desenvolvem-se bem entre 8 e 45°C e em pH de 4 a 8. A *Salmonella* Enteritidis é a espécie mais prevalente no mundo, seguida pela *Salmonella* Typhimurium (ACHA & SZYFRES, 2003).

A salmonelose é uma das principais zoonoses universais, sendo considerada um grave problema de saúde pública. O aparecimento de novos sorovares de *Salmonella* durante as duas últimas décadas, é devido ao uso indiscriminado de antibióticos, levando a um aumento significativo de hospitalizações, doenças invasivas e até a morte (VELGE *et al.*, 2005).

Os reservatórios de *Salmonella* zoonótica são principalmente os animais, sendo que qualquer alimento de origem animal pode ser uma fonte de infecção ao homem, como carnes de aves, bovinos, ovos, leite e seus subprodutos. Outra importante fonte de contaminação se dá por transferência da contaminação de produtos de origem animal, falta de higiene nas plantas processadoras e cozinhas (ACHA & SZYFRES, 2003).

2.1.3.5 *Listeria monocytogenes*

As doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* possuem um grande impacto na saúde pública e na economia mundial (GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

A *Listeria monocytogenes* é um microrganismo dos mais versáteis, podendo se adaptar a diferentes condições ambientais, bem como a uma ampla variedade de matérias-primas e alimentos processados, como leite e produtos lácteos, carnes e produtos cárneos, sendo que, além de patogênica, é também responsável por danos físicos e alterações químicas resultantes do metabolismo e crescimento microbiano no produto (GRAM *et al.*, 2002).

Amplamente distribuídas na natureza, as listerias podem ser encontradas em solos, fezes de animais, silagem, esgotos e água. Nos alimentos, a *Listeria*

monocytogenes, pode apresentar-se em variado número em qualquer alimento de origem animal e vegetal (JAY *et al*, 2005). Sendo resistente a diversas condições ambientais podendo crescer a temperaturas tão baixas quanto 3°C, permitindo sua multiplicação em alimentos refrigerados como produtos lácteos preferencialmente não curados, produtos cárneos e pescados (FORSYTHE, 2002).

CAPÍTULO 3

Artigo: Atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais – RBPM

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Herbário – Instituto de Biociências

Caixa Postal 510 UNESP – Campus de Botucatu

18618-000 – Botucatu – SP

Enviado em 26 de outubro de 2009.

Atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes

MAJOLO, C. ¹; CARVALHO, H. ¹; WIEST, J.M. ^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. * Correspondência: J.M.Wiest – ICTA/UFRGS, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91505-970, Porto Alegre – RS/Brasil. E-mail: jmwiest@ufrgs.br

RESUMO: Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia) de soluções contendo extratos hidroetanólicos e hídricos (decocto e infuso) de três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) a saber: Arroio do Meio/RS, Eldorado do Sul/RS e Maringá/PR, sobre inóculos padronizados de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114). Determinou-se, paralelamente, o teor de bixina destes nas sementes. Os extratos hídricos apresentaram baixa atividade de inibição e/ou inativação sobre os inóculos bacterianos, enquanto que a forma de extração hidroetanólica apresentou atividade antibacteriana seletiva e significativamente mais intensa (inibição/inativação) entre as cinco bactérias testadas. Independente da forma de extração, as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*. foram as mais sensíveis à atividade antibacteriana,

enquanto que *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade. Houve diferença significativa entre os teores de bixina entre os três acessos, e, conseqüentemente, a atividade antibacteriana determinada mostrou-se diretamente proporcional a estes teores.

Palavras-chave: *Bixa orellana*, atividade antibacteriana, inibição bacteriana, inativação bacteriana, bixina.

ABSTRACT: Antibacterial activity *in vitro* of different accessions of *Bixa orellana* L. (annatto) and its relationship with the content of bixin present in seeds. Through of Dilution Tests in Multiple Tubes System it was determined the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/bacteriostasy) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/bactericidie) from solutions containing hidroetanolic and hydric (decoction and infusion) extracts of tree accesses from *Bixa orellana* L. (annatto) at know:: Arroio do Meio/RS, Eldorado do Sul/RS and Maringá/PR, on standardized inocula of *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114). It was determined, in parallel, the content of bixin present in the three different accesses of the seeds. The forms of hydric extraction showed low inhibition and/or inactivation activity of the bacterial inocula, and the hidroetanolic extract form showed selective antibacterial activity and significantly pronounced inhibition/inactivation against the five bacteria tested. Independent of the extraction forms, *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes* were the more sensitive agents to the

antibacterial activity. *Escherichia coli* had the lowest sensitivity to all forms of extraction. The bixin contents were significantly different between the accesses and, consequently, the antibacterial activity was directly proportional to this contents.

Key words: *Bixa orellana*, antibacterial activity, bacterial inhibition, bacterial inactivation, bixin.

INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das maiores preocupações para evitar a contaminação microbiana por parte da indústria de alimentos é com relação ao uso de preservantes químicos, que podem, muitas vezes, ser substituídos por alternativas naturais, menos prejudiciais à saúde e muitas vezes, mais viáveis economicamente (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008).

Pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana de compostos naturais, sobre a multiplicação bacteriana, podem levar à sua utilização em novas tecnologias, melhorando a qualidade e a segurança alimentar (MAU *et al.*, 2001).

Em função do indiscriminado uso de drogas antimicrobianas e da perspectiva de seu uso futuro ser incerta, torna-se crescente o problema da resistência bacteriana, o que torna relevante o controle do uso destas drogas, bem como da pesquisa de novos antimicrobianos, tanto sintéticos como naturais ou a própria associação de ambos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Numerosas manifestações, conforme relatado por Livermore (2007), demonstram e justificam a necessidade de diminuir o uso de antimicrobianos em geral, conduzindo o uso dos mesmos da forma mais correta possível e adotando-se, cada vez mais, medidas profiláticas eficazes.

Bixa orellana L. (urucum) é uma árvore pequena, originária da América tropical, incluindo a Amazônia brasileira, com no máximo cinco metros de altura e de copa bem desenvolvida. As folhas são simples, glabras, medindo de oito a 11 centímetros de comprimento. As flores são levemente rosadas e o fruto é uma cápsula deiscente ovóide, com dois a três carpelos, cobertos por espinhos. Nas sementes encontra-se um óleo essencial rico em all-E-geraniolgeraniol, monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, além de carotenóides bixina e norbixina e em menor quantidade, alfa e beta-caroteno. Na medicina popular seu uso é bem pronunciado, principalmente para doenças coronarianas, afecções do estômago e intestino, afecções respiratórias, queimaduras, e como afrodisíaco (Lorenzi & Matos, 2002).

O uso de *Bixa orellana* L. (urucum) é muito pronunciado em diversos setores industriais, principalmente na área de laticínios. A substituição de muitos corantes sintéticos se deve à baixa toxicidade e baixo custo de produção do urucum, o que o tem tornado muito conveniente e atrativo (AGNER *et al.*, 2004).

Bixa orellana L. (urucum) é classificado como sendo um aditivo alimentar (corante), ou seja, toda substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento (BRASIL, 1997).

Atualmente, *Bixa orellana* L. (urucum) é muito utilizado na Comunidade Européia e Estados Unidos como corante natural em diversos alimentos (sorvetes, queijos, manteigas e peixes defumados) (DOWNHAM & COLLINS, 2000).

Estudos com *Bixa orellana* L. (urucum) relatam sua atividade antimicrobiana, demonstrando a capacidade preservativa desta planta na conservação e agregação de qualidade aos alimentos (BRAGA *et al.*, 2007; ROJAS *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2005; NALIMOVA *et al.*, 2005; FLEISCHER *et al.*, 2003; IROBI, 1996). Sendo

revelado por Galindo-Cuspinera & Rankin (2005) que as frações a base de norbixina foram responsáveis pela sua atividade antibacteriana principalmente frente à *Staphylococcus aureus*.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade bacteriostática/inibição e bactericida/inativação *in vitro* de extratos hidroetanólicos e hídricos (decocto e infuso) obtidos de sementes de diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) originários dos municípios de Arroio do Meio/RS, Eldorado do Sul/RS e Maringá/PR frente a agentes bacterianos padrões internacionais de interesse em alimentos, respectivamente *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114). Atividade esta, expressa como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia). Em síntese, manipulam-se as variáveis: bactérias, diferentes tipos de extração, diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), tempos de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos, bem como o teor de bixina presente nas sementes, permanecendo constante em 50% a concentração final de uso dos diferentes extratos nas denominadas soluções conservantes.

MATERIAL E MÉTODO

As sementes de *Bixa orellana* L. (urucum) foram coletadas em propriedade agroecológica familiar em Parque Eldorado, município de Eldorado do Sul/RS (coordenadas 30° 05' S e 51° 40' W); propriedade familiar no município de Arroio do Meio/RS (coordenadas 29° 24' S e 51° 56' W) e propriedade agrícola no município de Maringá/PR (coordenadas 23° 25' S e 51° 56' W).

Estes acessos foram obtidos devido à facilidade de coleta e de sua relação com o conhecimento popular local, relacionando os usos condimentares e medicinais (Arroio do Meio e Parque Eldorado) e de exploração agrícola (Maringá).

Em Arroio do Meio, moradores utilizam as sementes de urucum em decoctos para resfriados e redução de colesterol, em Eldorado do Sul, moradores utilizam as sementes na culinária, já em Maringá, o uso das sementes é mais pronunciado para a comercialização e uso industrial.

O material foi herborizado segundo Ming (1996) e identificado e catalogado pela bióloga Sílvia Marodin (CRBio/ RS n° 17268), sendo a duplicata botânica incorporada ao Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociência, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo números de registro 189642 (acesso Maringá/PR), 189643 (acesso Arroio do Meio/RS), 189644 (acesso Eldorado do Sul/RS).

As sementes de *Bixa orellana* L. (urucum), previamente secas, sob controle de temperatura e reidratação, foram submetidas aos processos de extração hidroetanólica e hídrica (decoção e infusão) para obtenção dos extratos, segundo Farmacopéia (1959), ITF (2008), LIMA (2008) e LORENZI & MATOS (2008). O extrato hidroetanólico foi elaborado a partir das sementes, colocadas em etanol, de cereais (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR), a 70 °GL, na proporção de 100g de sementes para 1000 mL de álcool. Após um período de quinze dias, o extrato foi submetido à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rota vapor, desprezando-se a porção alcoólica e reidratando-se o extrato resultante com água destilada estéril, reconstituindo-se as concentrações iniciais da planta. O decocto foi preparado na proporção de 100 g de semente para 1000 mL de água destilada estéril, mantido sob ebulição durante 20 minutos em aquecedor com refluxo

repondo-se assepticamente o volume inicial. Já para o infuso, utilizou-se a proporção de 100 g de semente para 1000 mL de água destilada estéril em ebulição depositada sobre as sementes por um período de 20 minutos. Para o controle permanente da assepsia dos procedimentos de extração e reconstituição, determinou-se a esterilidade de todos os extratos, retirando-se alíquotas de 5 mL, semeadas em tubos contendo 5 mL de Caldo-Cérebro-Coração (BHI, HIMEDIA, Mumbai/Índia), incubados aeróbicamente à 37 °C por até 48 horas, confirmando-se sua esterilidade, por plaqueamento em Agar Nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA, Maryland/Baltimore/USA).

Oportunizando o confronto entre os extratos e agentes bacterianos de interesse em alimentos, foram utilizadas amostras de inóculos padrões American Type Culture Collection (ATCC), para a avaliação da atividade antibacteriana (IINIB/bacteriostasia e IINAB/bactericidia) dos diferentes extratos de sementes quais sejam: *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114), provenientes da coleção-bacterioteca do Laboratório de Higiene de Alimentos do ICTA/UFRGS. Os inóculos foram reativados em meio de cultura BHI à 37 °C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbia, com o objetivo de atingir uma concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL para confrontação com os diferentes extratos de sementes de *Bixa orellana* L. (Urucum), através de diluições seriais logarítmicas (Avancini, 2002). A avaliação da concentração inicial foi realizada através da técnica da microgota, segundo Romeiro (2007) e a contagem de microrganismos viáveis concretizada em placas de Petri contendo meio de cultura PCA (Plate Count Agar, HIMEDIA, Mumbai/Índia). Foram realizadas diluições seriadas, a partir do inóculo inicial, transferindo-se 1 mL deste

para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (BIOBRÁS, Montes Claros/Brasil) para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-12} . De cada diluição foram transferidas isoladamente três gotas (alíquotas contendo 15 μ L cada) para placas de Petri utilizando micropipetas e a leitura realizada após 24 horas de incubação aeróbia à 37 °C. O valor final considerado constituiu-se da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos de sementes de *Bixa orellana* L. (Urucum), lida como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB), utilizou-se o Teste de Diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1980), com base na Técnica do Sistema de Tubos Múltiplos, referida por Souza & Wiest (2007), Avancini & Wiest (2008), Avancini *et al.* (2008) e Wiest *et al.* (2009), confrontando-se os três diferentes extratos com 12 diluições seriais logarítmicas (10^{-1} a 10^{-12} UFC/mL) dos diferentes inóculos bacterianos.

Entende-se por IINIB/bacteriostasia, o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio específico, e por IINAB/bactericidia, o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos acrescentados ao BHI (DVG, 1980; Andrade & Macedo, 1996; Reybrouck, 1979, Reybrouck, 1998, Souza & Wiest, 2007, Avancini & Wiest, 2008, Avancini *et al.*, 2008 e Wiest *et al.*, 2009). Estes valores são representações da atividade biológica inibitória/bacteriostasia ou inativadora/bactericidia de diferentes soluções antibacterianas sobre os microrganismos.

Os resultados de Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de 12 a 0, sendo que o valor de 12 (doze) representa atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade, como demonstra o Quadro 1 a seguir.

QUADRO 1. Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-----|--|
| 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | Variáveis ordinais de intensidade de atividade |
| 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} | 10^{-10} | 10^{-11} | 10^{-12} | n.a | UFC/mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas |
| 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | 10^1 | 1 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | n.a | UFC/mL – doses infectantes inibidas ou inativadas |
| n.a: ausência de atividade antibacteriana; UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mL. | | | | | | | | | | | | | |

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) dos diferentes extratos de *Bixa orellana* L. (Urucum) foram tratados através do programa de análises estatísticas Sisvar 5.0. Os resultados foram avaliados através da Análise de Variância (Anova) e teste de Tukey.

Para a determinação do teor de bixina nas sementes de *Bixa orellana* L. (urucum), foi utilizado neste trabalho o método KOH, citado por Veríssimo et al. (2008). Pesou-se 50 g de semente de *Bixa orellana* L. (urucum) em um Erlenmeyer de 500 mL, adicionou-se 150 mL de solução KOH 5% P/V, sendo esta mistura levada a ebulição e mantida neste estado por um minuto. Sem agitação, resfriou-se a mistura em água corrente. Posteriormente, filtrou-se em funil de vidro/lã de vidro, lavou-se as sementes com água destilada (100mL) por sete vezes, completou-se o

balão volumétrico até 1000 mL e homogeneizou-se por inversão. Transferiu-se uma alíquota de 2 mL desta solução para um balão volumétrico de 1000 mL, completou-se o volume com solução de KOH 0,5% P/V e homogeneizou-se por inversão. Leu-se a absorbância da solução em espectrofotômetro a 453 nm, em célula de um centímetro de percurso óptico, contra um branco de solução de KOH 0,5% P/V. Utilizou-se a seguinte equação para determinar a concentração de bixina nas amostras:

$$Bi\% = \frac{Ab \cdot fd \cdot V}{m \cdot E} \times 1,037$$

Onde: *Ab* representa a absorbância adimensional; *fd* é o fator de diluição (1000 mL); *V* é o volume inicial do extrato (1000 mL); *E* é o coeficiente específico de extinção (3473) adimensional; *m* representa a massa de semente (50 g); 1,037 é o fator de conversão para se expressar a concentração em termos de teor de bixina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando analisada a sensibilidade das cinco espécies bacterianas desafiadas frente aos três extratos de *Bixa orellana* L. (urucum) a 50%, provenientes de diferentes acessos, independentemente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos, houve diferença significativa entre as bactérias confrontadas, como mostra a Tabela 1. As bactérias que apresentaram maior sensibilidade à atividade antibacteriana foram *Enterococcus faecalis*, para os acessos Arroio do Meio/RS (8,3) e Eldorado do Sul/RS (5,5) e *Listeria monocytogenes* para o acesso Maringá/PR (6,9).

Tabela 1 - Análise da sensibilidade de cinco espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinfetantes bacterianos.

| Acesso Arroio do Meio | |
|--|----------------------|
| Espécies bacterianas | Valores Arbitrários* |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 4,5 ^a |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433) | 8,3 ^b |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19114) | 6,4 ^{ab} |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076) | 0,5 ^c |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) | 0,5 ^{cd} |
| Acesso Eldorado | |
| Espécies bacterianas | Valores Arbitrários* |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 5,4 ^a |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433) | 5,5 ^a |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19114) | 3,7 ^{ab} |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076) | 1,6 ^{bc} |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) | 0,2 ^c |
| Acesso Maringá | |
| Espécies bacterianas | Valores Arbitrários* |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 5,6 ^a |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433) | 5,9 ^a |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19114) | 6,9 ^a |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076) | 4,6 ^a |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) | 0,6 ^b |

* 12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 3 repetições)

0= não atividade

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna por acesso indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Na Tabela 2 verifica-se a eficácia da atividade antibacteriana dos três extratos de *Bixa orellana* L. (urucum) sobre os inóculos bacterianos em estudo. *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* apresentaram os maiores números arbitrários quanto a sensibilidade em todos os tipos de extração. A maior atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum) sobre estas bactérias foi obtida na forma de extração hidroetanólica, seguida por decocto e infuso que apresentaram atividades quase nulas sobre todas as bactérias testadas.

Tabela 2 - Análise da relação entre espécies bacterianas de interesse em alimentos e diferentes tipos de extração de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinfetantes bacterianos e tipo de acesso.

| Espécies bacterianas | | | | | |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Tipos de Extração | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Salmonella</i> Enteritidis | <i>Escherichia coli</i> |
| Hidroetanólica | 4,3 ^{aA} | 5,2 ^{aA} | 5,3 ^{aA} | 2,2 ^{aB} | 0,3 ^{aC} |
| Decocto | 0,1 ^{ba} | 0,1 ^{ba} | 0,1 ^{ba} | 0 ^{ba} | 0 ^{aA} |
| Infuso | 0,0 ^{ba} | 0,1 ^{ba} | 0,1 ^{ba} | 0 ^{ba} | 0 ^{aA} |

12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 3 repetições)

0= não atividade

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de extração e letras maiúsculas diferentes sobrescritas (^A) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey (p<0,05).

Quando avaliadas as três formas de extração (Tabela 2), independentemente das demais variáveis manipuladas, estas apresentam diferenças significativas entre si (p<0,05). A extração hidroetanólica apresenta valores superiores aos demais tipos de extração, seguida pelo decocto e infuso. Passos *et al.* (2009), Souza & Wiest (2007) e Girolometto *et al.* (2009), embora testando outras plantas, com a mesma metodologia, também obtiveram resultados superiores para a forma de extração hidroalcoólica e inferiores para os decoctos e infusos. Uma hipótese para estas diferenças refere-se a perda de componentes como óleos essenciais, mais especificamente o all-E-geraniolgeraniol, monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, além de carotenóides bixina e norbixina também presentes na *Bixa orellana*, quando das extrações por decocção e infusão onde se utilizam temperaturas mais elevadas (ebulição).

Analisando diretamente os números absolutos arbitrados, os três maiores valores de sensibilidade antibacteriana são encontrados, em ordem decrescente, na forma de extração hidroalcoólica atuando sobre, *Listeria monocytogenes* (5,3), *Enterococcus faecalis* (5,2) e *Staphylococcus aureus* (4,3).

Quando analisados os dois tratamentos com desinibidores/bactericida (IINAB) e sem desinibidores/bacteriostasia (IINIB) com relação à espécie bacteriana confrontada, independentemente do fator tempo de confrontação, observou-se diferenças significativas como mostra a Tabela 3. O tratamento IINIB (bacteriostasia/inibição pela ausência de desinibidores) apresenta resultado significativamente superior ao de IINAB (bactericida/inativação pela presença de desinibidores) para todas as espécies bacterianas com exceção da espécie *Salmonella* Enteritidis (acessos Arroio do Meio/RS e Eldorado do Sul/RS), *Escherichia coli* (todos acessos) e *Listeria monocytogenes* (acessos Arroio do Meio/RS e Eldorado do Sul/RS), ou seja, a ação bacteriostática dos extratos de *Bixa Orellana* é superior, em sua quase totalidade, à ação bactericida. Passos et al. (2009), Souza & Wiest (2007), Girolometto et al. (2009) e Carvalho et al. (2005) testando outras plantas e aplicando a mesma metodologia também obtiveram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB.

Tabela 3 - Análise da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas e extração por hidroalcolatura.

| Espécie bacteriana | Arroio do Meio | | | Eldorado | | | Maringá | | |
|-------------------------------|----------------|-------|---------|----------|-------|---------|---------|-------|---------|
| | IINIB | IINAB | p-value | IINIB | IINAB | p-value | IINIB | IINAB | p-value |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 4,7 | 0,2 | 0,0028 | 9,3 | 1,5 | 0,0125 | 9,3 | 2 | 0,0102 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 8,5 | 0,3 | 0,0004 | 10,5 | 0,5 | 0,0058 | 10,3 | 1,5 | 0,0189 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 6,5 | 2,3 | 0,0989 | 7,3 | 2,3 | 0,0590 | 10,3 | 1,5 | 0,0029 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | 0,5 | 0,5 | - | 2,3 | 1,0 | 0,0796 | 5,8 | 3,5 | 0,0029 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0,5 | 0 | 0,3910 | 0,3 | 0,1 | 0,3910 | 1,0 | 0,3 | 0,2152 |

12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 3 repetições)

0= não atividade

p-value < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pelo teste T, considerando espécies bacterianas e acessos.

A Tabela 3 analisa a presença ou ausência de desinibidores atuando sobre as diferentes bactérias. Os resultados apresentam uma maior atividade bactericida (IINAB, com desinibidor) para *Salmonella Enteritidis* (acesso Maringá/PR), seguida de *Listeria monocytogenes* (acesso Arroio do Meio/RS e Eldorado do Sul/RS) e de

Staphylococcus aureus (acesso Maringá/PR). Já a maior atividade bacteriostática (IINIB, sem desinibidor) é observada para *Enterococcus faecalis* (acesso Eldorado), seguido de *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* (acesso de Maringá/PR) e *Staphylococcus aureus* (acessos Maringá/PR e Eldorado do Sul/RS).

Outros autores descrevem atividade bactericida usando a planta *Bixa orellana* L. (urucum) sobre as mesmas bactérias, (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), porém com outras técnicas de avaliação de sensibilidade antimicrobiana. Gonçalves (2005), Irobi (1996) e Galindo-Cuspinera & Rankin (2005) observaram atividade antibacteriana frente à *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, observando sua ação eficaz principalmente frente a bactérias Gram-positivas, corroborando com os resultados deste trabalho.

A Tabela 4 avalia os tipos de acessos da espécie em estudo, mostrando sua atuação sobre os diferentes inóculos bacterianos e teor de bixina presente nas sementes, independentemente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos e da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (Urucum). Os resultados mostram que o extrato hidroetanólico do acesso Maringá/PR (3,11% de bixina) foi o mais eficiente em atividade antibacteriana, seguido do extrato de Eldorado do Sul/RS (1,33% de bixina), sendo o extrato de Arroio do Meio/RS (1,23%) o menos eficiente. O acesso Maringá/PR demonstrou maior teor de bixina, possivelmente por tratar-se de cultivar selecionado, submetido à otimização de manejo, enquanto os demais acessos constituem-se exemplares subespontâneos, individuais, semi-cultivados (BRAUN-BLANQUET, 1979; KENT & COKER, 1992).

Tabela 4 - Análise da relação entre os diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e teor de bixina presente nas sementes, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos e da presença ou da ausência de desinfetantes bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum).

| Acesso | Valores Arbitrários | Teor de bixina nas sementes (%) |
|--------------------|---------------------|---------------------------------|
| Arroio do Meio/RS | 2,4 ^a | 1,23 |
| Eldorado do Sul/RS | 3,5 ^b | 1,33 |
| Maringá/PR | 4,7 ^c | 3,11 |

12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 3 repetições)

0= não atividade

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os diferentes acessos para a análise de variância (Anova) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quanto às determinações de percentual de bixina dos diferentes acessos estudados, os resultados confirmam a hipótese inicial de que a relação entre o teor de bixina é diretamente proporcional à atividade antibacteriana, conforme evidenciado na Tabela 4.

Em síntese, todos os extratos hidroetanólicos de *Bixa orellana* estudados, apresentaram capacidade de inibição e/ou inativação seletiva, *in vitro*, sobre os cinco inóculos bacterianos de interesse em alimentos estudados. As bactérias mais sensíveis à atividade antibacteriana dos extratos, independente do tipo de extração, foram: *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*, enquanto *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade.

Nas condições do experimento permite-se concluir que:

A atividade antibacteriana de extratos de sementes secas de *Bixa orellana* apresentou-se seletiva, sendo que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis;

Independente da forma de extração, do acesso, inclusive da classificação bacteriana (Gram-positiva ou negativa) a Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) prevalece sobre a Intensidade da Atividade Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) de diferentes extratos de sementes secas

de *Bixa orellana* a 50%, com exceção de *Salmonella Enteritidis* para o extrato do acesso Arroio do Meio;

Diferentes acessos apresentaram atividade antibacteriana distinta, provavelmente relacionadas com solo, clima e disponibilidade de fitonutrientes, influenciando os teores de bixina presentes nas sementes;

As formas de extração que utilizam calor (decocto e infuso) podem interferir, provavelmente, na eficácia antibacteriana destes extratos, ou por extração ineficiente, ou por perda (evaporação) ou mesmo por desnaturação de princípios bioativos;

Os resultados sugerem a inclusão de *Listeria monocytogenes* como microrganismo alvo de um maior número de pesquisas, já que até então são evidenciados poucos estudos quanto ao uso de antibacterianos naturais frente a este agente causal;

Os resultados sugerem a continuidade de estudos objetivando a aplicação de diferentes métodos de obtenção de extratos de sementes de *Bixa orellana* L. (urucum), tanto para serem utilizados como solução conservante ou como condimentos alimentares, com perspectiva de qualidade, segurança e sensorialidade alimentar.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento continuados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver médium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n.10, p.1687-1693, 2004.

ANDRADE, N.J.DE; MACÊDO, J.A.B.DE. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela. 1996. 182p.

AVANCINI C.; WIEST J.M.; DALL'AGNOL R.; Haas J.S.; von Poser G.L. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.6, p.894-899, 2008.

AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum*- Cham e Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) — (“escadinha”/”sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre.

AVANCINI, C.A.M. et al. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.6, p.894-899, 2008.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, V.111, n.2, p. 267-271, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº540-SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento técnico para Aditivos alimentares**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> Acesso em: 10 ago. 2008.

BRAUN-BLANQUET, J. **Fitossociologia: bases para el estudio de las comunidades vegetais**. 1 ed. Madrid: M. Blume Ediciones, 1979. 820p.

CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.3, p. 25-32, 2005.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher, 1974. p.201-204.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. International. **Journal of Food Science and Tecnology**, v.35, n.1, p. 5-22, 2000.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). **Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. (Normas para o teste de desinfetantes químicos para a medicina veterinária)**. Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, Th.; STRAUCH, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. (Desinfecção aplicada à Produção Animal, a Frigoríficos e Laticínios)**. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 532p.

FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v.74, n.1-2, p.136-138, 2003.

GALINDO-CUSPINERA, V.; RANKIN, S.A. Bioauthography and Chemical Characterization of Antimicrobial Compound(s) in Commercial Water-Soluble Annatto Extracts. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.53, n.7, p. 2524-2529, 2005.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (“erva mate”) frente a bactérias zoonóticas em saúde e produção Animal**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3 p.353-358, 2005.

IROBI, O.N.; MOO YOUNG, M.; ANDERSON, W.A. Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. **International Journal of Pharmacognosy**, v.34, n.2, p. 87-90, 1996.

ITF. **Índice Terapêutico fitoterápico**. Ervas Medicinais. 1 ed. Petrópolis: EPUB, 2008.328p.

KENT, M.; COKER, P. **Vegetation description and analysis: a practical approach**. London: Blackwell, 1992, 544p.

LIMA, A. Remédios da Floresta. Como utilizar? **Enfermagem Atual**, v.8, n.46, p.34-40, 2008.

LIVERMORE, D.M., Introduction: the challenge of multiresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, n.3, p. S1-S7, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2008. 576p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

MAU, J.L.; CHEN, C.; HSIEH, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and conif fructus. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, n.1, p.183-188, 2001.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. Editora da UNESP. SP: 1996. p.69-86.

NALIMOVA, M.S.; PENÃ, S.G.R.; IZQUIERDO, M.F.C. Efecto in Vitro de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xantomonas*. **Fitosanidad**, v.9, n.3, p.49-51, 2005.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p. 247-256, 2000.

PASSOS, M.G. ; CARVALHO, H.; WIEST, J.M. Inibição e Inativação Bacterianas *in vitro* de diferentes formas de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“Alfavacão”, “Alfavaca”, “Alfavaca-Cravo”) – Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.71-78, 2009.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. **Bakteriologie und Hygiene. Zentralblatt: Abt. Orig. b.**, Stuttgart. V.68, p. 480-92, 1979.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p.269-72, 1998.

ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUÑOZ, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicines**, v.6, p.2, 2006.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2008.

SOUZA, A.A. **Aspectos etnobiológicos e avaliação da atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. - Verbenaceae - (“garupa”, “erva santa”) sobre agentes de importância em saúde e produção animal**. 2005. 87p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul-Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.23-9, 2007.

VERÍSSIMO, S.A.; OLIVEIRA, E.L.; LADCHUMANANANDASIVAN, R.; AQUINO, M.S.; ALEXANDRE, M.D.O. Aproveitamento do corante natural (Bixa Orellana) no tingimento de fibra celulósica. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.1, p. 35-39, 2008.

VIUDA-MARTOS, M. RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVARES, J.A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.3, p.526-531, 2008.

WIEST, J.M., CARVALHO, H.H.C; AVANCINI, C.A.M.; GONÇALVES, A.R. *Salmonella* sp: inibição e inativação *in vitro* de extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar, acessadas em Porto Alegre/RS/BR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.119 -127, 2009.

CAPÍTULO 4

Reapresentação dos resultados.

4 REAPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo, os resultados gerais do artigo, serão reapresentados sob a forma de gráficos.

4.1 Sensibilidade bacteriana

O Gráfico 1 apresenta o resultado da Análise da sensibilidade das cinco espécies bacterianas de interesse em alimentos frente a soluções conservantes de três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos. Houve diferença significativa entre as bactérias confrontadas, sendo que a bactéria que apresentou maior sensibilidade à atividade antibacteriana foi *Enterococcus faecalis*, para os acessos Arroio do Meio (8,3) e Eldorado (5,5) bem como *Listeria monocytogenes* para o acesso Maringá (6,9).

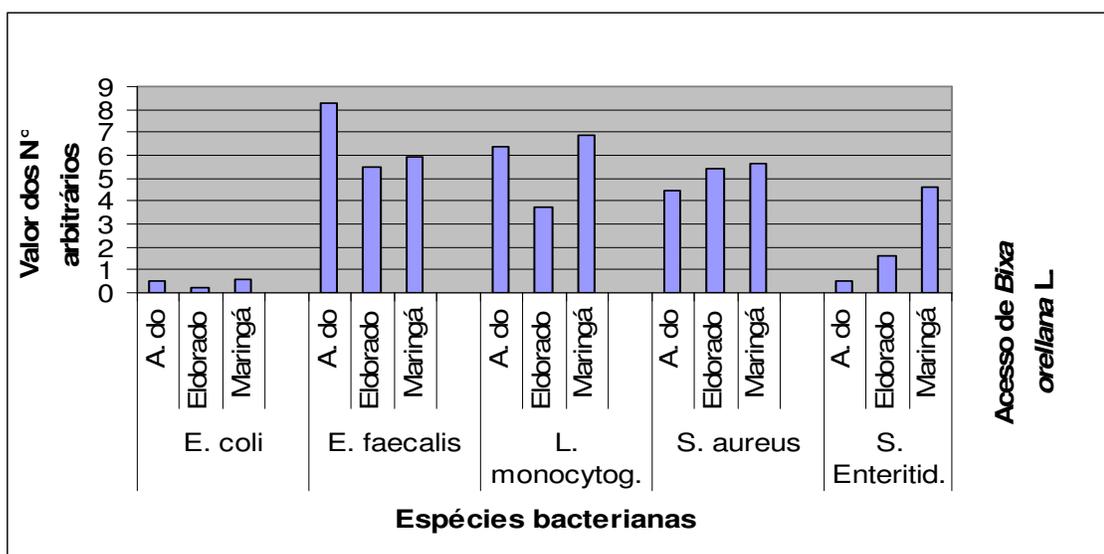


Gráfico 1 - Análise da sensibilidade de cinco espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes três acessos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tipo de extração, tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos.

4.2 Eficácia da atividade antibacteriana dos diferentes tipos de extração

O Gráfico 2 analisa a eficácia da atividade antibacteriana dos três extratos de *Bixa orellana* L. (urucum) obtidos sobre os inóculos bacterianos em estudo, dentre

estes, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* apresentaram a maior diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os tipos de extração. A maior atividade antibacteriana sobre estas bactérias foi obtida na forma de extração hidroetanólica, seguido da forma decocto e infuso que apresentaram atividades quase nulas sobre todas as bactérias testadas.

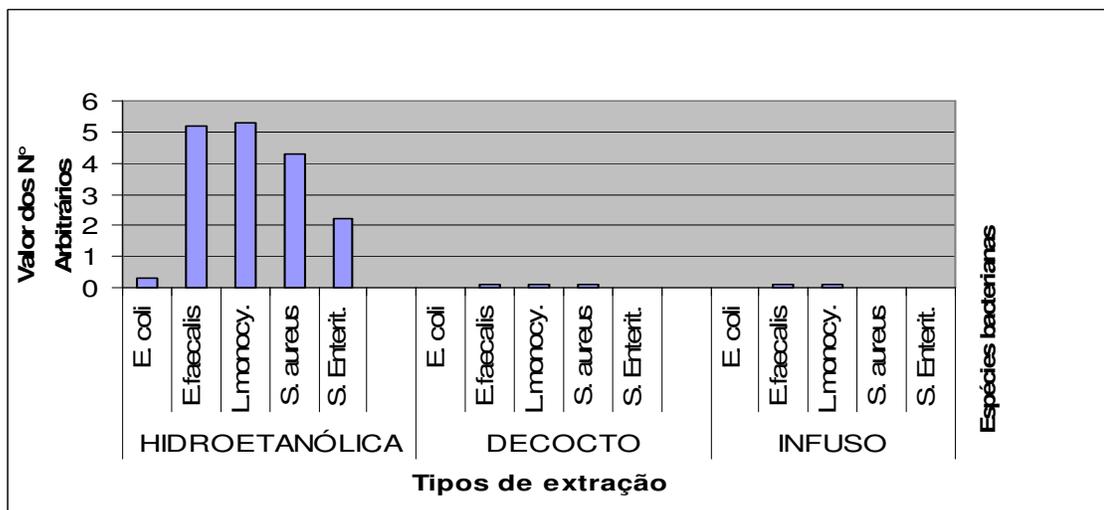
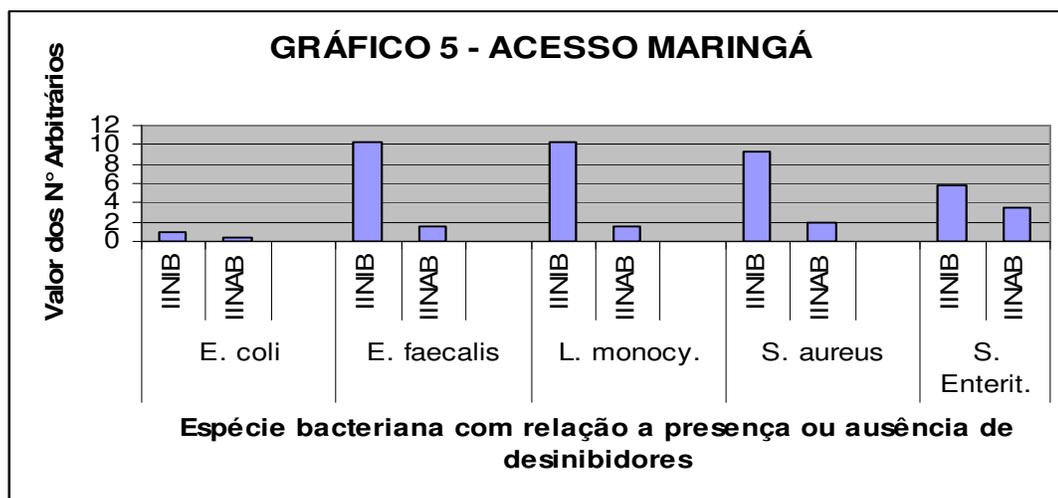
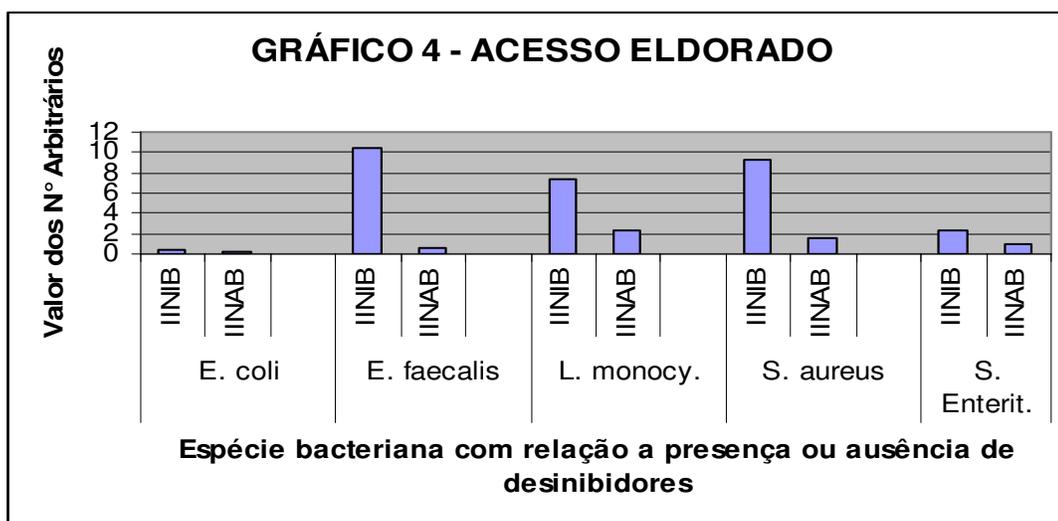
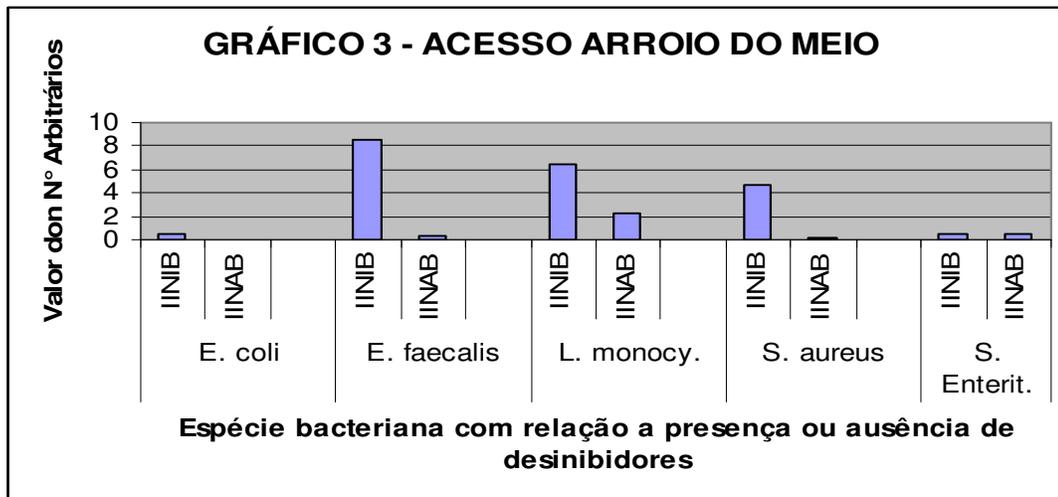


Gráfico 2 - Análise da relação entre espécies bacterianas de interesse em alimentos e diferentes tipos de extração de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desinibidores bacterianos e tipo de acesso.

4.3 Presença ou ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana

Quando analisados os dois tratamentos com desinibidores/bactericida (IINAB) e sem desinibidores/bacteriostasia (IINIB) com relação a espécie bacteriana confrontada, independentemente do fator tempo de confrontação, observou-se diferenças significativas como mostra os gráficos 3, 4 e 5. O tratamento IINIB (bacteriostasia/inibição pela ausência de desinibidores) apresenta resultado superior ao de IINAB (bactericida/inativação pela presença de desinibidores) para todas as espécies bacterianas com exceção da espécie *Salmonella* Enteritidis, ou seja, a ação bacteriostática dos extratos de *Bixa orellana* L. (Urucum) é superior a ação bactericida. Passos *et al.* (2009), Souza (2005), Girolometto (2005) e Carvalho (2005) testando outras plantas e aplicando a mesma metodologia também obtiveram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB.



GRÁFICOS 3, 4 e 5 - Análise da presença ou da ausência de desinfetantes bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas e extração hidroetanólica.

Os gráficos anteriores (3, 4 e 5) analisam a presença ou ausência de desinibidores atuando sobre as diferentes bactérias. Os resultados apresentam uma maior atividade bactericida (IINAB, com desinibidor) para *Salmonella* Enteritidis (acesso Maringá), seguida de *Listeria monocytogenes* (acesso Arroio do Meio e Eldorado) seguida por sua vez de *Staphylococcus aureus* (acesso Maringá). Já a maior atividade bacteriostática (IINIB, sem desinibidor) é observada para *Enterococcus faecalis* (acesso Eldorado), seguido de *Listeria monocytogenes* (acesso de Maringá) e *Staphylococcus aureus* (acesso Maringá e Eldorado), sendo que todos estes valores são diferentes significativamente entre si. Nos resultados obtidos destaca-se, novamente, que a ação bacteriostática é maior que a bactericida (IINIB>IINAB).

Outros autores descrevem atividade bactericida usando a planta *Bixa orellana* L. (urucum) sobre as mesmas bactérias, (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), porém com outras técnicas de avaliação de sensibilidade antimicrobiana. Gonçalves (2005), Irobi (1996) e Galindo-Cuspinera & Rankin (2005) observaram atividade antibacteriana frente à *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, observando sua ação eficaz principalmente frente a bactérias Gram-positivas, corroborando com os resultados deste trabalho.

4.4 Atividade antibacteriana x Teor de bixina nas sementes

O Gráfico 6 indica a performance dos tipos de acesso da espécie em estudo, mostrando sua atuação sobre os diferentes inóculos bacterianos e teor de bixina presente nas sementes, independentemente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos e da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana* L. (urucum). Os resultados mostram que o extrato hidroetanólico obtido do acesso Maringá/PR foi o mais eficiente em atividade antibacteriana, seguido do extrato de Eldorado, sendo o extrato de Arroio do Meio o menos eficiente.

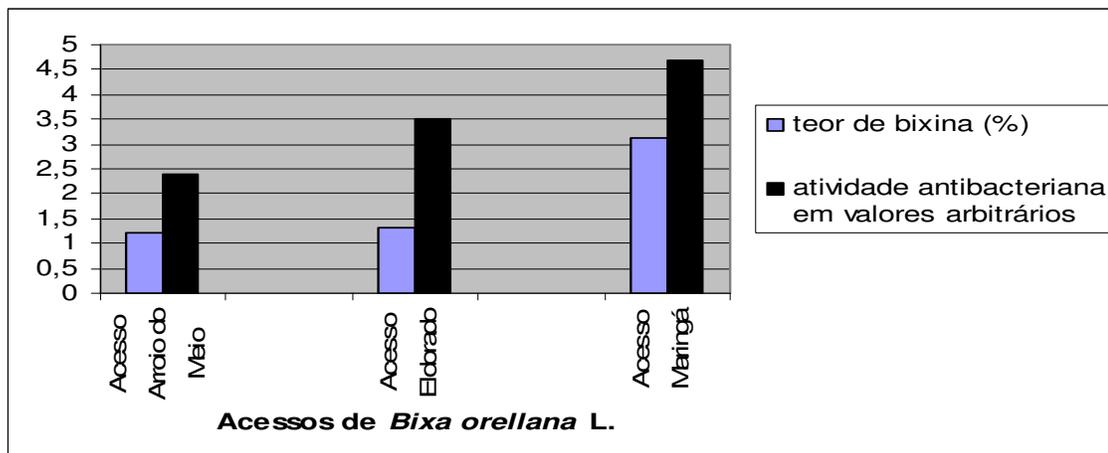


Gráfico 6 – Análise da relação entre os diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e o teor de bixina presente nas sementes, independente dos fatores tempo de confrontação e espécie bacteriana de interesse em alimentos e da presença ou da ausência de desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extratos de *Bixa orellana*.

Quanto às determinações de percentual de bixina dos diferentes acessos estudados, os resultados confirmam a hipótese inicial de que a relação entre o teor de bixina é diretamente proporcional a atividade antibacteriana, conforme evidenciado também no gráfico 6.

Em síntese, todos os extratos hidroalcoólicos de *Bixa orellana* L. (urucum) estudados, apresentaram capacidade de inibição e/ou inativação seletivas, *in vitro*, sobre os cinco inóculos bacterianos de interesse em alimentos estudados. As bactérias mais sensíveis à atividade antibacteriana dos extratos independente do tipo de extração foram *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*, justificando-se novamente, a inclusão deste importante patógeno nesta pesquisa considerando-se que o grupo não tem incluído este agente transmissível em suas triagens. Por outro lado enquanto que *Escherichia coli* apresenta menor sensibilidade ao extrato de *Bixa orellana* L. (urucum) obtido por extração hidroalcoólica.

REFERÊNCIAS GERAIS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B., **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3ªed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2003.v. 1

AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver médium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n.10, p.1687-1693, 2004.

ANDRADE, N.J.DE; MACÊDO, J.A.B.DE. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela. 1996. 182p.

AURELI, P.; CONSRARINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plants essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal Food Protection**, Iwoa, v.55, nº5, p.344-348, 1992.

AVANCINI C.; WIEST J.M.; DALL'AGNOL R.; Haas J.S.; von Poser G.L. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.6, p.894-899, 2008.

AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifolioatum*- Cham e Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) — (“escadinha”/”sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre.

AVANCINI C., WIEST J.M., DALL'AGNOL R., HAAS J.S. & von POSER G.L. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.6, p.894-899, 2008.

BARBOSA FILHO, J.M. Bixa orellana: Retrospectiva de seus usos populares, atividades biológicas, fitoquímicas e emprego na fitocosmética, no continente americano. Palestra apresentada no Simpósio Brasileiro do Urucum, João Pessoa,, 2006. Disponível em: http://artigocientifico.uol.com.br/uploads/artc_1160683981_32.pdf Acesso em: 10 abr. 2008.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, V.111, n.2, p. 267-271, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. Aprova Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> Acesso em: 10 abr. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº540-SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. **Regulamento técnico para Aditivos alimentares**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> Acesso em: 10 ago. 2008.

BRAUN-BLANQUET, J. **Fitosociologia**: bases para el estudio de las comunidades vegetais. 1 ed. Madrid: M. Blume Ediciones, 1979. 820p.

CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M.; GRECO, D.P. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisia dracunculis* Linn. (Asteraceae), variedade inodora – estragão -, frente à *Salmonella sp.* **Ciência e Tecnologia Alimentar**, Campinas, 26 (1), p.75-79, 2006.

CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.3, p. 25-32, 2005.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher, 1974. p.201-204.

CECÍLIO FILHO, A.B.; SOUZA, R.J.; BRAZ, L.T.; TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, nº1, p.171-175, 2000.

COELHO, A.M.S.P., SILVA, G.A., VIEIRA, O.M.C., CHAVASCO, J.K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta, Bragança Paulista**, v.21, n.1/2, p.47-54, jan./dez. 2003.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. International. **Journal of Food Science and Tecnology**, v.35, n.1, p. 5-22, 2000.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). **Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. (Normas para o teste de desinfetantes químicos para a medicina veterinária)**. Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, Th.; STRAUCH, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. (Desinfecção aplicada à Produção Animal, a Frigoríficos e Laticínios)**. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

EC. European Parliament and Council **Directive 94/36/EC** on colours for use in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, nºL237, p.13-29, 1994.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 532p.

FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v.74, n.1-2, p.136-138, 2003.

FORSYTHE, S. J., **Microbiologia da Segurança alimentar**. Porto Alegre: Arthmed, 2002, 424p.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci at the crossroad of food safety?. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, n.1-2, p.1-24, 1999.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n. 2-3, p.105-122, 2003.

GALINDO-CUSPINERA, V.; RANKIN, S.A. Bioauthography and Chemical Characterization of Antimicrobial Compound(s) in Commercial Water-Soluble Annatto Extracts. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.53, n.7, p. 2524-2529, 2005.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive, **Int. J. Food Microbiol.** v.113, n. 1, p. 1–15, 2007.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2008, 1032p.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (“erva mate”) frente a bactérias zoonóticas em saúde e produção Animal**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3 p.353-358, 2005.

GRAM, L.; RAYN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J.B.; BRUHN, J.B.; CHRISTENSEN, A.B.; MICHAEL, G. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria, **Int. J. Food Microbiol.** v. 78, p. 79–97, 2002.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D.R.; INÁCIO, C.V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciência Saúde Unipar**, Umuarama, v.11, n.3, p. 185-192, set./dez. 2007.

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

IROBI, O.N.; MOO YOUNG, M.; ANDERSON, W.A. Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. **International Journal of Pharmacognosy**, v.34, n.2, p. 87-90, 1996.

ITF. **Índice Terapêutico fitoterápico**. Ervas Medicinais. 1 ed. Petrópolis: EPUB, 2008.328p.

KENT, M.; COKER, P. **Vegetation description and analysis: a practical approach**. London: Blackwell, 1992, 544p.

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

JECFA, **Safety Evaluation of certain food additives and contaminants**. Sixty-Seventh Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report series No. 58, 2007.

LIMA, A. Remédios da Floresta. Como utilizar? **Enfermagem Atual**, v.8, n.46, p.34-40, 2008.

LIVERMORE, D.M., Introduction: the challenge of multiresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, n.3, p. S1-S7, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2008. 576p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.9, p. 1265-1273, 2003.

MAU, J.L.; CHEN, C.; HSIEH, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and conif fructus. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, n.1, p.183-188, 2001.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. Editora da UNESP. SP: 1996. p.69-86.

NALIMOVA, M.S.; PENÁ, S.G.R.; IZQUIERDO, M.F.C. Efecto *in Vitro* de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género Xantomonas. **Fitosanidad**, v.9, n.3, p.49-51, 2005.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p. 247-256, 2000.

PASSOS, M.G. ; CARVALHO, H.; WIEST, J.M. Inibição e Inativação Bacterianas *in vitro* de diferentes formas de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“Alfavacão”, “Alfavaca”, “Alfavaca-Cravo”) – Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.1, p.71-78, 2009.

PAUMGARTTEN, F.J.R.; DE-CARVALHO, R.R.; ARAUJO, I.B.; PINTO, F.M.; BORGES, O.O.; SOUZA, C.A.M.; KURIYAMA, S.N. Evaluation of the developmental toxicity of annato in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1595-1601, 2002.

PEREDA, J.A.O.; **Tecnologia de alimentos**, Porto Alegre: Artmed, 2005, 294p.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. **Bakteriologie und Hygiene. Zentralblatt: Abt. Orig. b.**, Stuttgart. V.68, p. 480-92, 1979.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p.269-72, 1998.

ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUÑOZ, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicines**, v.6, p.2, 2006.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2008.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SOUZA, A.A. **Aspectos etnobiológicos e avaliação da atividade antibacteriana de Aloysia gratissima (Gill et Hook) Tronc. - Verbenaceae - (“garupa”, “erva santa”) sobre agentes de importância em saúde e produção animal**. 2005. 87p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana de Aloysia gratissima (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul-Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.23-9, 2007.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, Campinas, v 21, n.3, p. 310-313, 2001.

VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BAROW, P. Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, v.36, n°3, p.267-288, 2005.

VERÍSSIMO, S.A.; OLIVEIRA, E.L.; LADCHUMANANANDASIVAN, R.; AQUINO, M.S.; ALEXANDRE, M.D.O. Aproveitamento do corante natural (Bixa Orellana) no tingimento de fibra celulósica. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.1, p. 35-39, 2008.

VIUDA-MARTOS, M. RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVARES, J.A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.3, p.526-531, 2008.

WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C.; AVANCINI, C.A.M.; GONÇALVES, A.R. In vitro inhibition and inactivation activity of Salmonella spp. by plant extracts with spicy or medicinal ethnographic indicative. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** V. 61 n.1 Belo Horizonte, 2009.

WIEST, J.M., CARVALHO, H.H.C; AVANCINI, C.A.M.; GONÇALVES, A.R. Salmonella sp: inibição e inativação *in vitro* de extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar, acessadas em Porto Alegre/RS/BR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.119 -127, 2009.

WILIAMS, R.J.; WARD, J.M.; HENDERSON, B.; POOLE, S.; O'HARA, B.P.; WILSON, M.; NAIR, S.P.. Identification of a Novel Gene Cluster Encoding Staphylococcal Exotoxin-Like Proteins: Characterization of the Prototypic Gene and Its Protein Product, SET1. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4407-4415, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana /bacteriostasia (IINIB) e Intensidade da Atividade Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) de diferentes extratos à 50% de *Bixa orellana* L. (urucum) segundo diferentes tempos de exposição e a presença ou ausência de desinibidores bacterianos, observados em triplicata.

Síncrise da Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana /bacteriostasia (IINIB) e Intensidade da Atividade Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) de diferentes extratos à 50% de *Bixa orellana* L. (urucum) segundo diferentes tempos de exposição e a presença ou ausência de desinibidores bacterianos, observados em triplicata.

Forma de extração: **Hidroetanólica**

| Acesso: | Tempo(h) | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Enterococcus fecalis</i> | | | <i>Listeria monocytogenes</i> | | | <i>Salmonella</i> Enteritidis | | | <i>Escherichia coli</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------|------------------------------|-------|----|-----------------------------|-------|---|-------------------------------|-------|----|-------------------------------|-------|---|-------------------------|-------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | IINIB | IINAB | | IINIB | IINAB | | IINIB | IINAB | | IINIB | IINAB | | IINIB | IINAB | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARROIO DO MEIO/RS | 24 | 7 | 7 | 7 | 1 | 1 | 1 | 8 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 5 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 9 | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 | 7 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 144 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 9 | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ELDORADO/RS | 24 | 7 | 7 | 7 | 3 | 3 | 3 | 8 | 8 | 8 | 2 | 2 | 2 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 48 | 10 | 10 | 10 | 3 | 3 | 3 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 12 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 8 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 144 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 12 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MARINGÁ/PR | 24 | 7 | 7 | 7 | 3 | 3 | 3 | 8 | 8 | 8 | 3 | 3 | 3 | 8 | 8 | 8 | 2 | 2 | 2 | 6 | 6 | 6 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | 48 | 10 | 10 | 10 | 3 | 3 | 3 | 9 | 9 | 9 | 3 | 3 | 3 | 12 | 12 | 12 | 1 | 1 | 1 | 6 | 6 | 6 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 10 | 10 | 10 | 2 | 2 | 2 | 12 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 144 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 12 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 | 12 | 12 | 8 | 8 | 8 | 5 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**APÊNDICE B – Laudo de Identificação botânica - *Bixa orellana* L.
(BIXACEAE)**

| Família Botânica | Nome científico | Nome popular | Hábito | Habitat | Origem | Nº ICN |
|------------------|-------------------------|--------------|-----------|---------|------------------|----------------------------|
| BIXACEAE | <i>Bixa orellana</i> L. | urucum | arbustivo | ruderal | América tropical | 18642, 18643 e 18644 |

Fonte: Marodin (2009)

MATERIAL EXAMINADO:

Nome científico: *Bixa orellana* L.

Material examinado: *Bixa orellana*: BRASIL. MARANHÃO, **A.Pinheiro**, Zé Doca (estrada carroçável), 8.VI.1979, *A.J.Castro et E.Nunes* ICN (066046). PARANÁ, **Maringá**, Fazenda Maringá, 21.VI.2009, *I.Majolo* ICN (189642). RIO GRANDE DO SUL, **Arroio do Meio**, 5.VII.2009, *C.Majolo* ICN (189643); **Eldorado**, sítio em Parque Eldorado, 10.VII.2009, *J.M.Wiest* ICN (189644); **Porto Alegre**, horto municipal, 21.XII.1939, *Irmão Augusto* ICN (18782).



Silvia Maria Marodin

(Bióloga, mestre em Botânica, área de taxonomia)