

INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CAMPUS PIÚMA

CURSO SUPERIOR EM ENGENHARIA DE PESCA

**KARLA ROSA VIANA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE FOLHAS DE  
ARAÇÁUNA NA CONSERVAÇÃO DO PESCADO**

PIÚMA  
2019

KARLA ROSA VIANA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE FOLHAS DE  
ARAÇÁUNA NA CONSERVAÇÃO DO PESCADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenadoria do Curso de Engenharia de Pesca do  
Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Piúma,  
como requisito parcial para a obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Regina Spago de  
Camargo Gonçalves.

PIÚMA

2019

Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP)

Bibliotecária responsável Ana Muller CRB6/ES 541

---

V614a Viana, Karla Rosa, 1993 -

Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato de folhas de aracaúna na conservação do pescado / Karla Rosa Viana. -- 2019.

55 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves.

Monografia (graduação) - Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Piúma, Coordenadoria de Curso Superior de Engenharia de Pesca, 2019.

1. Pescados – Microbiologia. 2. Pescados - Conservação. 3. Bactérias.  
4. Substâncias fenólicas. I. Gonçalves, Flávia Regina Spago de Camargo.  
II. Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Piúma. III. Título.

CDD: 664.001579

---


KARLA ROSA VIANA


**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE FOLHAS DE  
ARAÇÁUNA NA CONSERVAÇÃO DO PESCADO**

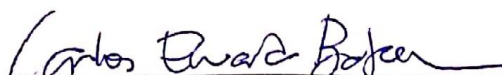
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenadoria do Curso de Engenharia de Pesca do  
Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Piúma,  
como requisito parcial para a obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia de Pesca.

Aprovada em 11 de dezembro de 2019.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves  
Instituto Federal do Espírito Santo  
Orientadora

  
Prof.<sup>a</sup>. MSc. Monique Lopes Ribeiro  
Instituto Federal do Espírito Santo

  
Prof. Dr. Carlos Eduardo de Araújo Barbosa  
Instituto Federal do Espírito Santo

Piúma  
2019

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,  
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.”*

*Charles Chaplin*

## **AGRADECIMENTOS**

Primordialmente, gostaria de agradecer a Deus, por tem me amparado em todos os momentos e sempre me fazer seguir em frente.

A meus pais, Ilzabete Rosa Viana e Luiz Carlos de Aguiar Viana, pelo apoio, compreensão, amor e carinho. As minhas irmãs, presente em valiosos momentos em minha vida, amo todos vocês. Ao meu namorado, mesmo em meio algumas dificuldades, por todo momento de ajuda carinho e compreensão compartilhados.

A minha orientadora Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves por ter aceitado me orientar, apoiando e melhorando a proposta inicial para TCC, e principalmente pelo apoio, compreensão e carinho demonstrados a mim nos momentos difíceis, a esta oportunidade concedida, muito obrigada por confiar e acreditar em mim!

Também gostaria de agradecer por todo conhecimento adquirido durante esses anos de trajetória e pelas oportunidades únicas que o Ifes – Campus Piúma pode proporcionar da melhor maneira possível. A todos os professores que passaram seu conhecimento, um mundo novo em suas aulas, agradeço a cada um de vocês.

A minha grande amiga Caroline Bindele do Nascimento, por tantos anos de amizade dentro e fora do curso, e por ter me ajudado a fazer esse TCC se tornar mais fácil contando com sua ajuda e opinião.

Aos meus colegas de laboratório e turma, Laura Dayrell, Emilly Baylet, e Nathan Gonçalves, que contribuíram imensamente para o meu crescimento pessoal e me ajudaram muito, que passaram a me trazer lembranças e momentos felizes.

As maravilhosas técnicas de laboratório, Suzana Bianchini e Daniella Alves, pessoas maravilhosas sempre dispostas a nos ajudar, com certeza o mérito desse trabalho é de vocês também, não seria possível sem a contribuição de vocês, muito obrigada!

Agradeço a banca, Monique Lopes e Carlos Eduardo Barbosa por terem aceitado e também por terem contribuído com seus conhecimentos ao longo do curso.

## RESUMO

A família Myrtaceae é conhecida por produzir substâncias antioxidantes, antimicrobianas e também de agentes antiproliferativos, destacando-se o gênero *Psidium*. A busca por alternativas naturais que possam ser utilizadas como conservantes na indústria de pescado, faz das espécies desse gênero potenciais fontes de compostos bioativos. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do extrato de folhas de araçauína (*Psidium* sp.) sobre microorganismos contaminantes do pescado. A preparação do extrato bruto de folhas de araçauína (EB) foi realizada através do método de maceração com álcool 95%, utilizando-se a proporção de 200 mL/50g entre solvente/pó fino. O fracionamento do EB foi realizado através do método de cromatografia líquida a vácuo e as frações obtidas foram avaliadas quanto à capacidade de sua atividade antimicrobiana. Os testes de ensaios microbiológicos *in vitro* para avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em disco. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima do EB. Para a estimativa da atividade antimicrobiana do EB no controle de patógenos no pescado refrigerado, foram realizadas contagens de *Staphylococcus aureus* (cepa FP) em UFC/g. Para as análises físico-químicas do pescado, foram realizados testes de determinação de bases nitrogenadas voláteis, pH, atividade de água e umidade. O EB e as frações obtidas foram capazes de inibir as bactérias em testes de difusão em disco. Os resultados obtidos mostraram que a concentração inibitória mínima do EB está entre 3,1 e 6,2 mg/mL, para o controle da cepa FP. Para os resultados das análises físico-químicas, todas as amostras estavam dentro dos padrões aceitáveis para BVT, pH, umidade e atividade de água. Após a análise sensorial, os filés determinados controles mostram uma visível degradação ao longo dos dias, enquanto os tratamentos com o EB aparentaram-se conservados, porém ocorreram alterações no odor e cor devido à composição química do EB. Os resultados demonstraram que o EB tem um grande potencial antimicrobiano, porém deve ainda ser estudado em relação à composição de suas substâncias bioativas para verificar se há algum grau de toxicidade para o consumo humano e assim determinar sua segurança para uso na indústria de processamento pesqueiro.

Palavras-chave: Myrtacea. Potencial antimicrobiano. Bactérias patogênicas. Substâncias bioativas.

## ABSTRACT

The Myrtaceae family is known for producing antioxidant, antimicrobial and antiproliferative agents, especially *Psidium* genus. The search for natural alternatives that can be used as preservatives in the fish industry makes these species potential sources of bioactive compounds. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial potential of the extract obtained by leaves of araçauína (*Psidium* sp.) on fish contaminated by microorganisms. The preparation of the raw extract of the leaves of araçauína (EB) was performed by the method of maceration with 95% alcohol, using the ratio of 200 mL/50g between solvent/fine powder. EB fractionation was performed by the vacuum liquid chromatography method and the fractions obtained were evaluated for their antimicrobial activity capacity. Tests *in vitro* to evaluate antimicrobial activity was performed by the disk diffusion method. The Minimum Inhibitory Concentration of EB was determined. To estimate the antimicrobial activity of EB in controlling pathogens in refrigerated fish, *Staphylococcus aureus* (FP strain) counts were performed in CFU/g. For the physicochemical analysis of the fish, tests were carried out to determine volatile nitrogen bases, pH, water activity and humidity. The EB and their fractions were able to inhibit the bacteria in disk diffusion tests. The results showed that the minimum inhibitory concentration of EB is between 3.1 and 6.2 mg/mL, to control FP strain. For the results of the physicochemical analysis, all samples were within acceptable standards for BVT, pH, humidity and water activity. After sensory analysis, the controls fillets show a visible degradation throughout the days, while the treatments with EB appeared conserved, but there were changes in odor and color due to the chemical composition of EB. The results showed that EB has a great antimicrobial potential, but it also should be studied in relation to the composition of its bioactive substances to verify if there is any degree of toxicity for human consumption and, thus, determine its safety for use in the fishing processing industry.

Keywords: Myrtacea. Antimicrobial Potential. Pathogenic bacteria. Bioactive substances.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Disposição dos discos embebidos com 10 µl de extrato, na placa de Petri contendo o meio de cultura previamente inoculado com o patógeno. ....	29
Figura 2: Filés de peróá inoculados com e sem extrato bruto de folha de arcaúna (EB) .....	32
Figura 3: Placa contendo <i>Staphylococcus aureus</i> para caracterização do patógeno.....	32
Figura 4: Halos de inibição da fração hexano e do extrato bruto contra <i>S. aureus</i> (cepa FP).....	36
Figura 5: <i>Staplylococcus aureus</i> presentes nas amostras sob refrigeração.....	39
Figura 6: pH das amostras sob refrigeração ao longo dos dias.....	40
Figura 7: Teor de atividade de água nas amostras analisadas sob refrigeração. ....	41
Figura 8: Teor de umidade das amostras sob refrigeração. ....	42
Figura 9: Mensuração do teor Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (mg/100g). ....	43
Figura 10: Controle dos filés com suspensão bacteriana.....	44
Figura 11: Tratamento dos filés com extrato bruto e suspensão bacteriana.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Halos de inibição (mm) em diferentes bactérias com extrato de araquína .....	35
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AN	Ágar Nutriente
BVT	Bases voláteis totais
BP	Ágar Baird Parker
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
ES	Espírito Santo
FP	<i>Staphylococcus aureus</i> isolado de filé de peixe
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
LP	<i>S.aureus</i> isolado de linguiça de peixe
mg	Miligramas
MgO	Óxido de Magnésio
g	Gramas
MH	Mueller Hinton
mL	Mililitros
µg	Microgramas
µm	Micrômetro
µL	Microlitros
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
SSE	Solução salina estéril (0,85%)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
3.1	BACTÉRIAS CONTAMINANTES DO PESCADO .....	17
3.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.1.2	<i>Salmonella spp.</i> .....	18
3.1.3	<i>Escherichia coli</i> .....	19
3.1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
3.1.5	<i>Vibrio sp.</i> .....	19
3.2	CONSERVAÇÃO DO PESCADO E SUA VIDA ÚTIL DE PRATELEIRA .....	20
3.3	FAMÍLIA MYRTACEAE .....	22
3.4	GÊNERO <i>PSIDIUM</i> .....	23
3.5	EXTRATOS VEGETAIS .....	24
3.6	ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DAS PLANTAS .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA .....	27
4.2	PREPARO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAÇÁUNA (EB) .....	27
4.3	RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E DAS SUAS FRAÇÕES .....	27
4.4	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAÇÁUNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA À VÁCUO .....	28
4.5	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO E DE SUAS FRAÇÕES .....	28
4.5.1	<b>Cepas bacterianas</b> .....	<b>28</b>
4.5.2	<b>Preparo do inóculo</b> .....	<b>28</b>
4.5.3	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco</b> ..	<b>28</b>
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAÇÁUNA .....	29
4.7	ATIVIDADE DE ÁGUA E pH DO PESCADO .....	30
4.8	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE .....	30

4.9	DETERMINAÇÃO DE BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS (BNV) .....	30
4.10	AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAÇÁUNA NA CONSERVAÇÃO DO PESCADO.....	31
4.10.1	<b>Caracterização do patógeno .....</b>	<b>32</b>
4.10.2	<b>Análises microbiológicas .....</b>	<b>33</b>
4.10.3	<b>Análise sensorial do pescado .....</b>	<b>33</b>
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
6.1	IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA.....	34
6.2	RENDIMENTO E APARÊNCIA DO EXTRATO PÓS EVAPORAÇÃO DO ÁLCOOL.....	34
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO EXTRATO BRUTO E DA FRAÇÃO .....	34
6.3.1	<b>Testes de inibição por difusão em disco .....</b>	<b>34</b>
6.3.2	<b>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....</b>	<b>37</b>
6.4	ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO DO PESCADO.....	38
6.4.1	<b>Análise de estafilococos.....</b>	<b>38</b>
6.4.2	<b>pH e atividade de água.....</b>	<b>39</b>
6.4.3	<b>Umidade .....</b>	<b>41</b>
6.4.4	<b>Bases voláteis .....</b>	<b>42</b>
6.4.5	<b>Análise sensorial .....</b>	<b>43</b>
7	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos originários do processamento de pescado são perecíveis por natureza e, assim, necessitam de proteção contra a sua deterioração durante seu preparo, armazenamento e distribuição, a fim de assegurar o tempo de prateleira desejado. A conservação é a arte que incide em manter o alimento o mais durável possível, e esse processo envolve três características: as físicas, as químicas e as biológicas (LEONARDI, AZEVEDO, 2018).

No mercado há uma grande demanda por antimicrobianos e conservantes naturais para aplicações em diferentes áreas de estudo. É fato que, pesquisas intensas têm sido realizadas buscando extração, caracterização e utilização de antioxidantes naturais, tais como óleo essencial e extratos de plantas que são potentes candidatos no combate a patologias relacionadas à oxidação (OZEN, DEMIRTAS, AKSIT, 2011).

Algumas substâncias, artificiais ou extraídas da natureza são consideradas conservantes, pois, quando usadas em alimentos não influenciam suas características físicas, químicas e nutritivas. Essas substâncias podem ser subdivididas em três grupos: os antioxidantes, que evitam o contato do produto com oxigênio; os inibidores enzimáticos, que atuam nas enzimas impedindo a aceleração das reações que alteram o estado físico-químico do produto; os antimicrobianos, que matam ou inibem o crescimento de micro-organismos deteriorantes (LEONARDI; AZEVEDO, 2018).

Ao passar do tempo, a resistência adquirida por bactérias patogênicas aos antibióticos existentes e as grandes exigências pelo uso de produtos naturais como conservantes de alimentos, tornam imprescindível a busca por novos metabólitos que possam ser utilizados no controle de micro-organismos na indústria de pescados (GABRIEL, 2012). Uma das alternativas, é a utilização de extratos de plantas com poder antimicrobiano na conservação pescado.

Com milhares de espécies de plantas disseminadas nos cinco principais biomas - Mata atlântica, Cerrado, Amazônia, Pantanal e Pampa - o Brasil tem o mais rico e completo bioma vegetal do planeta (MORAIS, CONCEIÇÃO, NASCIMENTO, 2014). Com isso, há grande variedade de espécies vegetais pouco estudadas e que podem gerar o interesse de consumidores e indústrias, tanto na área farmacêutica como na área alimentícia. Porém, ainda há poucos estudos de identificação de compostos

fitoquímicos com atividade antimicrobiana de espécies nativas brasileiras (SOBRAL, PROENÇA et al, 2014). Estudos realizados com alguns frutos, tais como goiaba, araçá, pitanga, cambuci, grumixama, araçá amarelo, cereja e camu-camu, sendo eles de diferentes espécies, mas pertencentes a família Myrtaceae, demonstraram média e alta concentração de compostos fenólicos, incluindo presença de flavonóides, além de atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa (CUNHA, 2014). De acordo com Egea e colaboradores (2014), a espécie *Psidium cattleianum* é uma fonte de antioxidantes naturais, antimicrobianos e também de agentes antiproliferativos, tornando-se importante o estudo de espécies desse mesmo gênero.

A espécie conhecida popularmente como araçauína é uma espécie vegetal nativa da Mata Atlântica brasileira, pertencente à família Myrtaceae, gênero *Psidium*. Ocorre da Bacia do Rio Paraná e em toda a extensão da Mata Atlântica, do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul. Seus frutos são arredondados, chegando a 3 cm de diâmetro, com casca variando entre verde, púrpura até negro, de acordo com a maturação. A polpa é carnosa, arroxeadada, levemente ácida e adocicada, com 4 a 7 sementes (CERESINO, 2012). Essa planta é pouco estudada e sua identificação ainda é controversa.

Diante do exposto acima, sabendo da probabilidade das espécies pertencentes à família Myrtaceae possuírem compostos bioativos e inúmeras atividades biológicas, e do pouco conhecimento relacionado à araçauína, torna-se interessante o estudo dessa planta, a fim de avaliar o seu potencial antimicrobiano no controle de micro-organismos contaminantes do pescado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano de extratos de folha de araquáuna no controle de micro-organismos contaminantes do pescado.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato bruto de folhas de araquáuna;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato bruto de folhas de araquáuna;
- Fracionar os extratos obtidos por cromatografia líquida à vácuo, utilizando solventes orgânicos de polaridade crescente;
- Avaliar o potencial do extrato bruto de folhas de araquáuna e de suas frações obtidas no controle de patógenos *in vitro*;
- Avaliar a utilização dos extratos de araquáuna na conservação do pescado.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 BACTÉRIAS CONTAMINANTES DO PESCADO

O peixe tem a carne mais suscetível à deterioração microbiana por conta da sua elevada atividade de água e teor de gorduras facilmente oxidáveis, tendo o pH próximo da neutralidade (pH 6,6-6,8), que são fatores que mais favorecem o desenvolvimento das bactérias causadoras de doenças no homem (SILVA et al, 2008).

De acordo com Germano e Germano (2003), o muco que cobre a superfície externa do peixe e brânquias, contém bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Escherichia coli*. Estes e diversos outros micro-organismos, podem estar presentes no pescado devido à sua extensa cadeia produtiva, no beneficiamento, conservação, distribuição, transporte e armazenamento, até alcançar o consumidor final, comprometendo a qualidade do produto disponível.

Águas mais poluídas atribuem maior contaminação ao pescado. Um dos exemplos são as espécies de água doce capturadas em viveiros cujos piscicultores utilizam a técnica de cultivo “consórcio”, onde criam porcos e peixes paralelamente. Grande parte dos micro-organismos estão aderidos no muco, na pele, no fluido intestinal e nas guelras do pescado, além de ter que levar em conta o local onde ele foi capturado. (VIEIRA, 2003).

##### 3.1.1 *Staphylococcus aureus*.

O *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar (FRANCOIS et al., 2007). É muito conhecido o envolvimento dessa bactéria em casos de intoxicação alimentar, ocasionados principalmente pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas produzidas por ela, este organismo vem causando esse tipo de transtorno há séculos (DACK, 1964).

O caminho mais comum de contágio por essa bactéria nos alimentos é através de uma ferida contaminada, possivelmente quando um trabalhador do ramo alimentar não protege adequadamente um ferimento infectado em sua mão (FARIA, 2008). Suas toxinas ocasionam três quadros clínicos de contaminação, a intoxicação

alimentar estafilocócica (gastroenterite), síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico. Adquirem facilmente resistência aos antibióticos e a transmitem entre si (PACHECO, 2008). Em sua forma mais grave pode ocorrer desidratação, dor de cabeça, dores musculares, e alterações na pressão sanguínea e na frequência cardíaca. A morte de um paciente infectado é considerada muito rara, mas podendo ocorrer em crianças, idosos ou em indivíduos com a saúde debilitada correlacionada com o grau de intoxicação apresentada (IARIA et al, 1980).

É uma bactéria anaeróbia facultativa, com formação de colônias em forma de cachos de uva, capaz de produzir as enzimas catalase e coagulase, responsáveis por infecções frequentemente adquiridas tanto no meio hospitalar quanto pela população em geral (PACHECO, 2008). Seu diagnóstico é fácil, principalmente quando existe um grande número de casos, com curto intervalo de ingestão de um alimento em comum (IARIA et al., 1980).

### 3.1.2 *Salmonella spp.*

A salmonela é uma bactéria que vive geralmente em águas com a presença de material orgânico, contaminada por esgoto, podendo está presente também em alguns alimentos mal processados ou que não passou pelo cozimento. Para consumir um alimento de forma segura, ele deve ser exposto a temperatura superiores a 74 °C, devendo ser homogêneo, cozinhando a parte interna do alimento. Considerado um micro-organismo bastante agressivo, pode chegar a levar o infectado a óbito em poucas horas (OLIVEIRA et al, 2013; CARDOSO; CARVALHO, 2006). É uma bactéria Gram-negativa que possui células forma de bastonetes (Bacilos) imóveis, com temperatura de 37°C para um bom crescimento, capaz de sobreviver por longos períodos em alimentos com baixa atividade de água (SILVA et al., 2010).

Todas as suas espécies são consideradas patogênicas para o homem, em vários graus de infecções. São anaeróbias facultativas, sua contaminação se dar mais em alimentos que não passam por processamento algum, como maionese, clara de ovos, sushi, entre outros, mas ocorre também em outros pratos, principalmente quando não há uma higienização correta das mãos e de utensílios utilizados em sua preparação e manuseio (BRASIL, 2011). Após a ingestão da salmonela, em questão de horas

podem-se manifestar sintomas como as dores abdominais, vômito, febre, diarreia com muco ou sangue (BESSA, 2006).

### 3.1.3 *Escherichia coli*.

Caracterizada por ser uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae, anaróbia facultativa, não esporulada, e com células em forma de bastonetes, conhecidos bacilos, podendo ser móveis ou imóveis (possuir ou não flagelos). Tem como principal habitat o trato intestinal de animais de sangue quente (ALMEIDA, 2013). A sua transmissão pode ser causada por contato direto com animais, contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados por esta bactéria. Seus sintomas mais comuns abrangem a diarreia com muco, febre baixa, dores abdominais, dor no estômago, falta de apetite, gases, náuseas, vômito, dor de cabeça, fadiga, mialgia, entre outros. Pode causar ainda infecção urinária, principalmente nas mulheres, por conta da proximidade do ânus com a vagina, o que torna a transmissão mais fácil de um local para o outro (NATARO; KAPER, 1998).

### 3.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*.

Um patógeno oportunista emergente, com resistente a diversos antibióticos, de forma bacilos Gram-negativos aeróbios, encontrados em matéria orgânica em decomposição. Um patógeno oportunista, comumente está introduzido em áreas desprovidas de defesa (mucosa ou pele danificadas por lesões, caracteres intravenosos ou intraurinários, entre outras) (JUNIOR, 2006). As infecções causadas por essa bactéria se dão principalmente em pacientes que já sofriam de outra doença ou lesão, podendo originar três tipos de infecções graves, infecção aguda localizada nos olhos, infecção crônica dos pulmões e infecção grave e disseminada em organismos com sistema imunológico deficiente (FERREIRA & SOUZA, 2000)

### 3.1.5 *Vibrio sp.*

Os vibrios são morfologicamente bacilos Gram-negativos não esporogênicos, móveis, em sua maioria com um único flagelo que habitam ambientes tipicamente marinho e estuarino, necessitando do cloreto de sódio para seu crescimento, sendo comumente isoladas no pescado. Cerca de 11 espécies do gênero são patógenas ao ser humano (SANTIAGO *et al.*, 2013). O *Vibrio parahaemolyticus* vem sendo cada vez mais

associado a casos de gastroenterite causada por consumo de peixes, moluscos e crustáceos marinhos (SILVEIRA *et al.*, 2016).

### 3.2 CONSERVAÇÃO DO PESCADO E SUA VIDA ÚTIL DE PRATELEIRA

O peixe é constituinte de uma fonte de proteínas de elevado valor biológico, sendo tão importante quanto a carne bovina, tendo como o componente que apresenta maior variação a água, correlacionada à espécie e à época do ano em que o pescado é capturado, podendo abranger cerca de 53% a 80% da composição química total (GONÇALVES, 2011). A sua composição química varia de espécie para espécie. Os fatores mais responsáveis por esta variação, está relacionado com o tamanho, a alimentação, a estação do ano e o local de captura do peixe, mas também em um mesmo exemplar, a composição química vai depender da parte do corpo que está sendo analisada (VIEIRA, 2003).

Essa carne de origem animal tem um grande destaque por apresentar uma composição química simbólica que lhe confere alto valor biológico, proteína de alta digestibilidade, rica em aminoácidos essenciais, possuindo proteínas com um valor nutritivo ligeiramente elevado comparada a carnes vermelhas, sendo um alimento mais saudável do ponto de vista nutritivo (GONÇALVEZ, 2011).

O pescado após a sua morte assim como qualquer outro animal, sofre uma série de alterações que colaboram para sua degradação, sendo um dos alimentos mais perecíveis e mais susceptíveis ao processo de deterioração. Portanto, este exige cuidados e técnicas convenientes de conservação e higiene para garantir que o produto chegue com qualidade até o consumidor final. As técnicas de conservação e higiene para o pescado são regidas pela legislação federal, desde a sua captura até sua chegada ao consumidor. O modo como o pescado será manipulado nesse intervalo de tempo, irá determinar a intensidade das alterações enzimáticas, oxidativas e microbiológicas (GONÇALVES, 2011; SILVA, 2008).

As proteínas do pescado são facilmente degradadas por micro-organismos decompositores, necessitando de um cuidado especial desde sua captura até sua chegada ao consumidor. Sua deterioração ocorre logo após sua morte, pois o pescado possui uma microflora específica endógena, mais especificamente depois da fase de Rigor Mortis, que é quando é consumida a última reserva de carboidratos em seu

corpo. A deterioração avança gradativamente com o passar do tempo, até o estágio de putrefação. Algumas medidas simples, como uma manipulação correta do alimento, podem aumentar sua vida de prateleira, já que após a captura o pescado pode contaminar-se por micro-organismos do solo, água, e até mesmo pelas bactérias encontradas nas mãos (AGENTA, 2012;).

Uma correta e adequada manipulação e armazenamento podem inibir a proliferação de organismos deteriorantes e retardar a ação de enzimas, o que acrescenta a vida de prateleira do produto evitando que o consumidor apresente alguma reação de intoxicação ou até mesmo adoeça por contaminação transmitida pelo alimento (GAVA et al., 2008). Múltiplos métodos de conservação são utilizados atualmente, tais como a salga, cozimento, desidratação, salga, congelamento, adição de aditivos químicos, entre outros (CABRAL, 2012).

- Conservação pelo calor: Expõem o alimento a temperaturas elevadas afim de eliminar os micro-organismos presentes. Os métodos de conservação pelo calor mais comuns são a pasteurização, a esterilização e a ebulição (DIONYSIO; MEIRELLES, 2017).
- Desidratação e secagem: Diminui-se a atividade de água do produto, o que inibe o crescimento de micro-organismos e a atividade enzimática. Existem diversas técnicas, dentre elas a secagem ao sol, retirada de água com a utilização de ar aquecido, fervura, liofilização, adição de sal ou açúcar e condensação (CELESTINO, 2010).
- Conservação pelo Frio: Expõem o alimento a baixas temperaturas, quanto menos a temperatura, mais eficaz é o procedimento, o que inibe as reações químicas de deterioração natural e as atividades enzimáticas. Duas técnicas: refrigeração (-1 a 8°C) e congelamento (abaixo de -10°C) (CINTRA, 2014).
- Substituição por gorduras: Ocorre uma troca de gorduras insaturadas, que são mais propícias a oxidação, por gorduras saturadas, sendo a substituição pela gordura trans muito comum nesse tipo de procedimento (CELESTINO, 2010).

- Aditivos Químicos: Consiste na adição de substâncias na preparação de alimentos processados. Podem ter origem natural ou química. Como exemplo os conservantes, corantes, emulsificantes, antioxidantes, dentre outros (MARQUES, 2001).
- Salga: Seu princípio baseia-se na adição de sal, que em concentrações adequadas, é capaz de retardar a decomposição do alimento. No procedimento, a ação do sal é dupla, ao penetrar na musculatura ele diminui a quantidade total de água existente, o deixando o exemplar que foi salgado menor, e permanece no interior do pescado, diminuindo a atividade de água, ou seja, a disponibilidade do líquido para a ação de enzimas e crescimento de *micro-organismos* (FERREIRA *et al.*, 2009).

Visto que uma má conservação pode ocasionar diversos danos ao ser humano, onde segundo a Organização das Nações Unidas, no ano de 2008, aproximadamente 82 milhões de brasileiros apresentaram problemas com intoxicação alimentar, onde destes, 6 mil vieram a óbito (NESPOLO, 2015)

### 3.3 FAMÍLIA MYRTACEAE

O Brasil é altamente reconhecido pela sua diversidade biológica de sua flora (PEREIRA *et al.*, 2012), onde são localizados 10 centros de diversidade de fruteiras nativas no país, tendo no sétimo lugar a Mata Atlântica, localizado na região Sul e Sudeste, com agrupamento das fruteiras dos gêneros *Eugenia*, *Campomanesia*, *Psidium*, *Plinia* e *Acca* (DONADIO *et al.*, 2002), as quais pertencem à família Myrtaceae.

A família Myrtaceae contempla pelo menos 130 gêneros e 3.800 espécies distribuídas ao redor do mundo incluindo muitos frutos que são usados devido as suas propriedades medicinais e importância como fonte alimentar (A *et al.*, 2008). Nesta família ainda se incluem os gêneros *Eugenia*, *Myrcianthes*, *Campomanesia* e *Psidium*, sendo que o gênero *Psidium* caracteriza cerca de 100 espécies, que podem ser encontradas ao longo dos trópicos e subtropicais da América e da Austrália. No Brasil, este gênero pode ser encontrado ao longo de todo o território, da região da Amazônia ao estado do Rio Grande do Sul (FABIANE, 2019; MARIN *et al.*, 2008).

As espécies frutíferas desta família apresentam características de frutos pequenos, com grande potencial econômico que podem ser colhidos para comercialização, para consumo in natura ou para uso na fabricação de sorvetes, sucos, iogurtes, licores, sobremesas, barras de cereais, doces, geleias (MÜLLER et al., 2012).

Na ornamentação, destacam-se as espécies *Eugenia sprengelii* e *Leptospermum scoparium*. E como medicinais destacam as *Eucalyptus globulus* L., que é empregado no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite; e *Myrciaria dubia*, apresentando alto teor de vitamina C, segundo informações etnofarmacológicas (LORENZI, 2002 & COUTINHO, 2010). E também apresentam grande importância ecológica, pois seus frutos suculentos e carnosos são fontes de alimento para a fauna silvestre. Conseqüentemente os animais que se alimentam desses frutos acabam veiculando a dispersão de suas sementes e favorecendo a sobrevivência e permanência dessas espécies (COUTINHO, 2010).

### 3.4 GÊNERO *PSIDIUM*

No gênero *Psidium*, são caracterizadas cerca de 100 espécies, onde a que mais se destaca é a goiabeira (*P. guajava*) (VIEIRA et al., 2006). As espécies de *Psidium* incidem em áreas sob condições de constantes estresse abiótico, incluindo a água e os extremos de temperatura (HAMINIUK et al, 2006). Esta adaptação da espécie a condições de tensão, geram frutos que apresentam metabólitos secundários potencialmente ricos, que por sua vez conseqüentemente, possuem propriedades funcionais de interesse (JACQUES, PERTUZATTI, BARCIA, & ZAMBIAZI DE 2009).

Essas espécies são ricas em compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenos, que são normalmente associados com propriedades biológicas importantes tais como o aumento da proteção contra a oxidação celular, atividades antimicrobiana e anticancerígenas, entre outras, assim como os óleos essenciais que podem ser extraídos das folhas e de outras partes da planta (KATALINIC' et al, 2010; LINK, BALAGUER, e GOEL, 2010).

Das espécies de *Psidium* produtoras de frutos comestíveis, as que merecem maior destaque, atualmente, são *P. cattleianum* e *P. guineense* (VIEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014), especialmente pelos atributos de seus frutos, como o sabor exótico, alto teor de vitamina C e boa aceitação pelos consumidores. Porém, muitas

outras espécies desse gênero merecem atenção por parte da pesquisa, com potencial de uso e exploração comercial, industrial e farmacêutica (MELO et al., 2013).

### 3.5 EXTRATOS VEGETAIS

Industrialmente, nos dias atuais plantas têm sido utilizadas para diferentes propósitos, principalmente em ingredientes de produtos medicinais, potencializadores de beleza, fragrâncias e alimentos (MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). A procura pelo uso de produtos naturais é uma boa estratégia para o descobrimento de novas formas de conservantes e até mesmo de medicamentos. De acordo com a organização mundial da saúde, 25% dos remédios modernos são feitos a partir de plantas utilizadas tradicionalmente na medicina popular (WHO 2002).

Desde os tempos primórdios da humanidade, as pessoas usam plantas para propósitos nutricionais, medicinais e religiosos (SILVA, BARREIRA e OLIVEIRA, 2016). Publicada pela World Health Organization (WHO) em 2003, uma pesquisa reporta que 5,6 bilhões de pessoas, sendo aproximadamente 80% da população mundial, vem utilizando produtos naturais nos primeiros cuidados com a saúde, para depois optar por medicamentos químicos não naturais. Estima-se que este número tende-se a aumentar, pois após a comprovação das propriedades medicinais de diversas plantas, a flora se tornou um recurso vantajoso de compostos com importantes funções na prevenção e no tratamento de doenças e na melhoria da saúde (SILVA, BARREIRA e OLIVEIRA, 2016).

Plantas e seus constituintes são uma excelente fonte de pesquisa, pois os produtos de seu metabolismo, os compostos bioativos, atuam de forma similar àqueles que operam em seres humanos e animais (GURIB-FAKIM, 2006). Os antioxidantes naturais que estão presentes nas frutas e vegetais podem ser extraídos de suas matrizes originais e se tornando disponíveis para serem empregados como ingredientes funcionais em alimentos (BAIANO e DEL NOBILE, 2016).

Uma importante fonte de antioxidantes é formada pelos resíduos sólidos do processamento mínimo de frutas e vegetais tais como casca, semente, caules e outras frações que normalmente são descartadas (LAROZE, ZÚÑIGA, SOTO, 2008). O termo antioxidante se refere a compostos que podem cancelar ou inibir a oxidação de



várias moléculas, impedindo a iniciação ou propagação da reação em cadeia da oxidação e assim agindo como agentes redutores (BREWER, 2011).

Com o aumento da exigência por produtos naturais que trazem benefícios à saúde, a identificação do método mais efetivo para extração de compostos ativos de plantas tem se tornado importante. Os métodos de extração herbais, tradicionalmente são preparados fervendo em água as raízes, folhas ou toda a planta, têm sido utilizados para práticas medicinais a mais de 5.000 anos (NUNN, 2002, MOHAMMAD-AZMIN et al., 2016). Mas este aumento na demanda também se deve ao aumento da consciência dos efeitos colaterais causados pelo uso de produtos de origem química (BREWER, 2011).

Para a realizar a extração, faz-se necessário que as plantas devem sejam pré-processadas, necessitando ser secas para diminuir a atividade de água e assim prevenir o crescimento de bactérias e também restringir o crescimento de fungos durante o armazenamento (SIM, KUMARESAN, SARMI, 2004). As condições impostas no processo de extração são determinantes da bioatividade de compostos naturais, estes compostos assumem a classificação de compostos hidrofílicos (polares) ou hidrofóbicos (apolares) e o grupo presente no extrato depende, principalmente, do solvente utilizado. Compostos como os fenólicos, flavonoides, ácidos orgânicos e açúcares são exemplos de compostos polares e para os compostos apolares temos os carotenoides, alcaloides, terpenos, ácidos graxos, tocoferóis e esteróis (BRAVO, 1998; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os vários tipos e abundantes antioxidantes contidos em frutas e vegetais abrangem vitamina C, carotenoides, e fenólicos, enquanto que tocoferóis e tocotrienóis estão presentes em relativamente baixos níveis em frutas e vegetais quando comparado com castanhas e grãos (KALT, 2005).

### 3.6 ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DAS PLANTAS

Sendo influenciadas por múltiplos fatores, tais como a espécie vegetal, partes da planta, clima, altitude, tempo de coleta e fase de crescimento, a composição e concentração dos componentes dos óleos essenciais e extratos vegetais são bastante variáveis. Alguns fatores fazem o óleo ou extrato proveniente de uma mesma espécie, ou até mesmo de um mesmo exemplar, mas em estações e/ou safras diferentes

apresentarem diferenças quantitativas e qualitativas na sua composição (SANTOS; NOVALES, 2012; SANTURIO, 2015), sendo assim, variações na estrutura e composição química desses compostos resultam em diferenças na sua ação antimicrobiana (SAVOIA et al., 2012).

As bactérias patogênicas são um dos problemas maiores e mais comuns, tanto para a indústria de alimentos quanto para o setor de saúde pública, podendo causar infecções transmitidas pelo alimento contaminado ou intoxicações, que são comuns e frequentes entre a população mundial (CDC, 2017). Os conservantes sintéticos comumente empregados para o controle microbiano, na indústria de alimentos, têm sofrido crescente rejeição por parte dos consumidores, que têm buscado alimentos que mais se aproximam do natural (CALO et al., 2015).

Produtos naturais, provenientes de plantas, proporcionam atividade antimicrobiana decorrente à presença de substâncias que são principalmente metabólitos oriundos do seu metabolismo secundário, estes atuam no mecanismo de ação inibindo ou eliminando bactérias patogênicas. Esses metabólitos têm uma ampla atuação de atividades, de acordo com a espécie da planta utilizada (SAVOIA et al., 2012).

Santurio (2015) observou, ao testar óleos essenciais para o controle de bactérias patogênicas em alimentos adicionados em produtos cárneos, que eles podem aumentar a vida útil e diminuir a contaminação de patógenos. Estudos recentes têm conceituado a utilização de antimicrobianos como bioconservantes naturais para alimentos, aplicando diretamente no alimento (DANNENBERG et al., 2016) ou, em embalagens (DANNENBERG et al., 2017), onde ambos exemplos têm demonstrado bom potencial para aplicação tecnológica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

Os materiais vegetais de araçáúna foram coletados nos municípios de Piúma (20°50'20.8"S 40°43'29.7"W) e Anchieta (20°48'29.8"S 40°40'50.9"W), no litoral sul do estado do Espírito Santo, Brasil. Foram montadas três exsiccatas de cada planta coletada e depositadas no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo.

### 4.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAÇÁÚNA (EB)

As folhas coletadas foram examinadas e assim removidas as partes danificadas por micro-organismos ou insetos, lavadas com água corrente, desinfetadas com hipoclorito de sódio 2%, enxaguadas em água destilada e secas em estufa à 50°C até sua desidratação. As folhas secas foram maceradas até obter um pó fino, utilizando a técnica de maceração com cadinho e pistilo. Para a obtenção do EB, o material em pó foi peneirado em peneira de 100 mm, e 50 g do pó fino foi embebido em 200 ml de álcool etílico absoluto e submetido a descanso por 72 horas abrigado da luz, sendo agitado manualmente em intervalos de tempo. Após as 72 horas o extrato foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos e finalmente filtrado em papel de filtro Whatman N° 41. O álcool do extrato filtrado foi evaporado em temperatura ambiente, com o auxílio de um cooler dentro da capela de exaustão de gases e armazenados em frascos com tampa e mantidos em freezer a -20°C.

### 4.3 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E DAS SUAS FRAÇÕES

O rendimento dos extratos e frações obtidos das folhas da araçáúna foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Extrato/fração rendimento \%} = R/S \times 100$$

Onde: R = peso do extrato/fração

S = peso da amostra bruta da planta.

#### 4.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAÇÁUNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA À VÁCUO

Foi realizado o fracionamento do EB bruto através de um funil de separação, utilizando n-hexano, diclorometano, metanol e água como solventes, de acordo com sua polaridade, adotando a ordem crescente de polaridade (do apolar para o polar) com uma proporção de 1 g do EB para 10 mL de solvente, repetindo-se 3 vezes o processo, totalizando 30 ml de solvente para a amostra testada.

As frações coletadas foram denominadas: fração 1 (hexano), fração 2 (diclorometano), fração 3 (metanol) e fração 4 (água), as quais foram submetidas à evaporação em temperatura ambiente na capela de exaustão de gases, logo após armazenadas a -20° C.

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO E DE SUAS FRAÇÕES

##### 4.5.1 Cepas bacterianas

O potencial antibacteriano do EB foi avaliado usando cinco cepas bacterianas causadoras de intoxicação alimentar, sendo três linhagens de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* (cepa FP), *S. aureus* (cepa LB) e *Bacillus cereus*) e três cepas de bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Vibrio parahaemolyticus*), mantidas criopreservadas em glicerol 20% a -80 °C.

##### 4.5.2 Preparo do inóculo

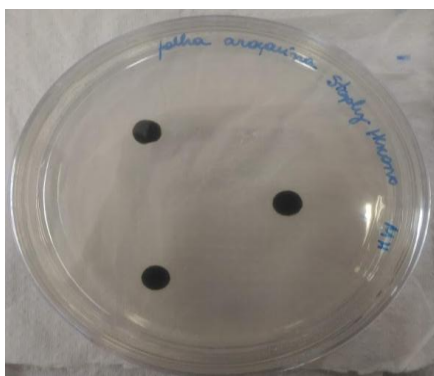
As bactérias foram previamente cultivadas por cerca de 24 horas a uma temperatura de 35 °C em caldo nutriente. Após o período de incubação, preparou-se as suspensões em solução salina estéril (0,85%) (SSE) para utilização nos testes de atividade antimicrobiana. As suspensões de células bacterianas foram homogeneizadas e sua densidade ajustada para  $10^8$  UFC/mL, utilizando um espectrofotômetro (UV VI SSPECTRO 580UVP).

##### 4.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco

Com as densidades ajustadas para  $10^8$  ufc/mL, as suspensões bacterianas foram semeadas com o auxílio de um *swab* estéril na superfície das placas contendo Ágar

Müller-Hinton, de modo a obter crescimento uniforme das bactérias no meio de cultura, com exceção do *V. parahaemolyticus* que foi semeado em Ágar Nutriente contendo 3% de NaCl. Os discos de papel filtro de 6 mm (foram preparados colocando-se 10 µL 500 µg/disco) de uma das frações ou do EB, diluído em seu respectivo solvente de extração. Após secos em câmara de fluxo laminar até a evaporação do solvente, com o auxílio de uma pinça estéril, três discos (três repetições) contendo o extrato foram colocados sobre o meio (Figura 1) inoculado com cada patógeno, em seguida as placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. A inibição do crescimento microbiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição ao redor dos discos após 24 horas de incubação a 37 °C, e os resultados foram expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições. Com o mesmo inóculo de bactérias o tratamento controle foi realizado, utilizando discos embebidos apenas no solvente, com o intuito de comprovar que os halos obtidos são provenientes da ação antibacteriana do EB da folha da araquáua e não do solvente.

Figura 1: Disposição dos discos embebidos com 10 µl de extrato, na placa de Petri contendo o meio de cultura previamente inoculado com o patógeno.



Fonte: Autor.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAQUÁUA

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada em microplacas de 96 poços, utilizando um inóculo dos patógenos a  $10^8$  ufc/mL e a diluição do EB nas concentrações de 5000 µg, 2500 µg, 1250 µg, 625 µg, 312 µg, 156,25 µg e 78,12 µg, 39,06 µg, 19,53 µg, 9,77 µg, 4,88 µg e 2,44 µg. O controle positivo foi realizado através do inóculo da bactéria no meio de cultura, o controle do extrato foi realizado, nas

mesmas concentrações, em conjunto com o meio de cultura sem a bactéria e, o controle negativo foi realizado apenas com o meio de cultura (SPAGO *et al.*, 2014), incubadas por 24 horas a 35 °C. Após o período das 24 horas, 25 µL de cada concentração foram plaqueadas pelo método de espalhamento em superfície utilizando alça de Drigalski em meio Ágar Nutriente ( AN) e incubadas por 24 horas a 35 °C. A CIM foi determinada considerando o intervalo entre a última placa onde houve crescimento bacteriano e a primeira onde houve inibição.

#### 4.7 ATIVIDADE DE ÁGUA E pH DO PESCADO

A atividade de água ( $A_w$ ) foi medida a 25°C utilizando um analisador de  $A_w$  (AQUA LAB Dew Point Water Activity Meter 4TEV) de leitura direta. Para a determinação do pH foram pesados cerca de 5 g de amostra picada e misturados em 20 mL de água destilada, sendo misturado em um agitador magnético por 5 minutos com a imersão do pHmetro. Ambas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

O teor de umidade foi medido pelo método gravimétrico por secagem da amostra em estufa a 105°C. Cadinhos identificados foram colocados em uma estufa a 105 °C por 40 minutos para retirada total de sua umidade, logo foram retirados e esfriados por uma hora em dessecador contendo sílica gel. Os cadinhos preparados foram identificados de acordo com a amostra a receber e pesados, então se pesou aproximadamente 5,0 gramas de amostra de filé de peixe (*Balistes capriscus*), o qual foi colocado na estufa a 105 °C por 24 horas (processo realizado em triplicata). Após as 24 horas, os cadinhos foram retirados e resfriados em dessecador, pesados e calculados a perda de umidade segundo a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DE BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS (BNV)

Cerca de 25 g de filés de pescado foi triturado em liquidificador juntamente com 75 mL de ácido tricloroacético 5% (TCA), sendo esta mistura bem homogeneizada. A solução homogeneizada foi filtrada em um funil de vidro com filtro de papel (Whatman Nº 41). Retirou-se 10 mL da solução filtrada e foi transferido para um tubo digestor de proteínas com 1g de MgO e 20 mL de água destilada, onde passou por um processo

de destilação no destilador de Nitrogênio (SL-74). Depositou-se em um Erlenmeyer, 20 mL de uma solução receptora (ácido bórico) com algumas gotas de indicador misto (verde bromocresol e vermelho de metila) deixando a solução rosa, após o processo de destilação a solução adquiriu uma coloração azul e foi titulada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,01 M) até a viragem (cor azul virar rosa claro), em seguida calculou-se o volume de ácido gasto para a titulação. O processo foi realizado em triplicata.

O cálculo de BNV é expresso em mg N/100g de músculo. Para isto, utilizou-se a fórmula representada pela Equação 1:

$$\text{Equação 1: BNV} = \frac{\text{mL de HCL} \times \text{N} \times 14 \times 100 \times 134}{25 \times 25}$$

Onde:

\*mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é o volume de ácido sulfúrico gasto para a titulação.

\*N = normalidade do HCl

\*134 corresponde à fração líquida total que estaria contida em 25 g de peixe extraídos com 120 mL de TCA.

De acordo com Contreras-Gúzman (1988), a carne de peixe apresenta em média cerca de 70 % de água, onde, 25 g contribuiriam com aproximadamente 14g de água, que somada a 120 mL resulta em 134 de fração líquida total (CONTRERAS-GÚZMAN, 1988).

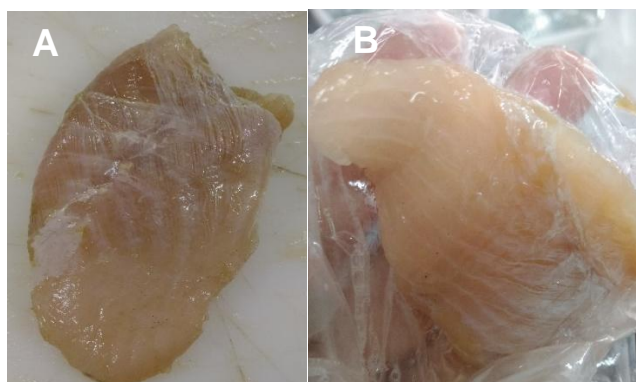
#### 4.10 AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE ARAÇÁ NA CONSERVAÇÃO DO PESCADO

A bactéria escolhida para os ensaios de conservação do pescado foi o *S. aureus* (cepa FP), previamente isolada de linguiça de peixe, no Laboratório de Ecologia Microbiana do Ifes – Campus Piúma.

Foram pesadas alíquotas contendo 25 g de filés de peixe, Peroá branca (*Balistes capricus*), em triplicata, para cada tratamento. As amostras do tratamento contendo o EB foram aspergidas com 1 mL do extrato diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e SSE 1:1 (v/v) na concentração 1250 µg e 1 mL de suspensão bacteriana de *S. aureus* (10<sup>8</sup> UFC/mL). Os filés do grupo controle foram aspergidos com 1 mL de suspensão bacteriana de *S. aureus* (10<sup>8</sup> UFC/mL) e 1 mL de DMSO/SSE 1:1 (v/v). Todas as

amostras foram embaladas em sacos plásticos próprios para armazenamento de alimentos e estocadas em geladeira a 7 C° durante 6 dias, sendo realizadas análises periódicas microbiológicas, físico-químicas e sensoriais iniciadas a partir do 0 dia de estocagem e posteriormente no 2º dia, 4º dia e 6º dia pós estocagem (Figura 2).

Figura 2: Filés de peróá inoculados com e sem extrato bruto de folha de araquáuna (EB). A) Contendo 1 mL de EB em DMSO/SSE 1:1 (v/v) e 1 mL de suspensão bacteriana; (B) Contendo 1 mL suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* e DMSO/SSE 1:1 (v/v).

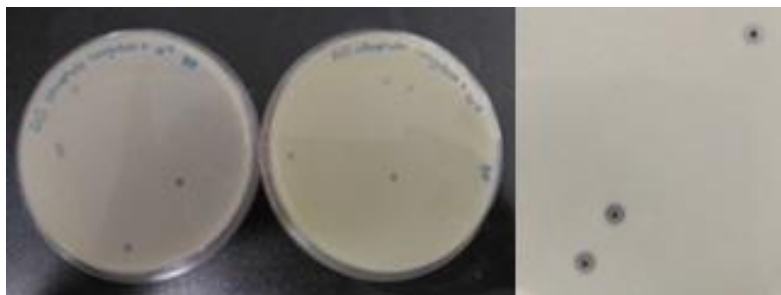


Fonte: Autor.

#### 4.10.1 Caracterização do patógeno

Para a caracterização do patógeno fez-se uma suspensão bacteriana de *S. aureus* (cepa FP) na densidade ótica de 0,03, plaqueando-se 50 µL dessa suspensão, numa diluição de  $10^{-6}$ , na superfície do meio de cultura Ágar Baird-Parker (BP), acrescido de gema de ovo com telurito de potássio (BP). As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 35 °C, durante 48 horas e posteriormente verificou-se a morfologia da bactéria e as alterações que ela causou no meio (Figura 3).

Figura 3: Placa contendo *Staphylococcus aureus* para caracterização do patógeno.



Fonte: Autor.



#### 4.10.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a NBR ISO 6888-1 de junho de 2019, que estabelece um método horizontal para enumeração de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). O número de UFC foi calculado.

#### 4.10.3 Análise sensorial do pescado

A qualidade do pescado, durante os dias de experimento, foi avaliada em relação à sua aparência, odor e textura, através dos sentidos da visão, olfato e tato, sendo considerado um dos métodos rápido e básico para avaliar o frescor do pescado.

### 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o programa de análises estatísticas BioEstat 5.3 desenvolvido pelo Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. Foram analisadas a normalidade dos dados e os resultados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

As exsiccatas depositadas no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo aguardam a identificação por especialistas e, portanto, ainda não foi possível determinar a espécie do gênero *Psidium* que corresponde à planta conhecida popularmente como araçauína.

### 6.2 RENDIMENTO E APARÊNCIA DO EXTRATO PÓS EVAPORAÇÃO DO ÁLCOOL

O rendimento dos extratos, calculado a partir de 50 g do pó fino da folha de araçauína, mostraram-se bastante satisfatórios, sendo que o EB inicial obteve um rendimento de 34,14%, mostrando-se um rendimento superior ao esperado. Após a cromatografia líquida à vácuo, o rendimento das frações foram: 18,73% para o extrato da fração de hexano, 9% para fração de metanol e 0,69% para a fração do diclorometano. A aparência do EB mostrou-se consistente, pegajoso e oleoso, o que pode ser explicado pela variedade de compostos encontrados em sua complexa composição, e que segundo Jardim et al (2015), pode variar de acordo com a combinação de fatores como a localização geográfica de coleta da espécie, com sua linhagem clonal, suas características edafo-botânicas, a estação do ano em que a espécie foi coletada, causando então uma série de condições que podem vir a interferir em suas propriedades biológicas e bioativas. Portanto, a obtenção de um extrato com formulação homogênea devido a essas diversidades de fatores, ainda é um desafio a ser superado.

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO EXTRATO BRUTO E DA FRAÇÃO

#### 6.3.1 Testes de inibição por difusão em disco

Os testes de inibição por difusão em disco foram realizados contra os patógenos *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, duas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* sp. e obteve-se os resultados descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Halos de inibição (mm) em diferentes bactérias com extrato bruto de araçáúna.

Extrato	Cepas bacterianas					
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	<i>B. Cereus</i>	<i>Salmonella sp.</i>
Extrato bruto	2 ± 0,08	3,3 ± 4,7	19,3 ± 1,2	10,7 ± 0,9	15 ± 2,2	0
Fração hexano	3,3 ± 4,7	0	18,3 ± 1,2	9,8 ± 1,2	13,3 ± 1,7	0
Fração diclorometano	0	0	15,3 ± 1,2	0	0	0
Fração metanol	8,3 ± 0,4	0	20 ± 0,8	8,8 ± 1,1	8,3 ± 0,4	0

<sup>1</sup> *S. aureus* isolado de filé de peixe (cepa FP)

<sup>2</sup> *S. aureus* isolado de linguça de peixe (cepa LP)

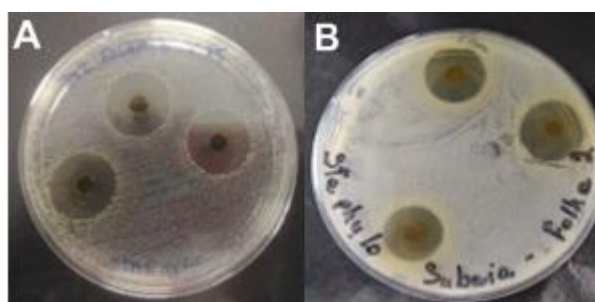
Fonte: Autor

Observou-se que os extrato/frações foram mais eficazes no controle das cepas de *S. aureus* e *B. cereus*, evidenciando uma melhor atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Tanto EB quanto as frações hexano e metanol inibiram o crescimento dessas bactérias, não diferindo significativamente entre si. A fração diclorometano foi capaz de inibir apenas a cepa de *S. aureus* mais sensível, sendo ineficaz no controle das demais bactérias. Em relação as bactérias Gram-negativas, a fração metanol foi a mais eficaz, com um halo de 8,3 mm produzido no controle de *V. parahaemolyticus*. Salvagnini e colaboradores (2008), em resultados obtidos pelo ensaio de difusão em disco do extrato de *Myrtus communis* da família Myrtaceae, mostraram que as bactérias *E. coli* e *B. subtilis* apresentaram resistência, sendo que frente a *E. coli* o óleo extraído da mesma planta não mostrou atividade inibitória. O efeito antibacteriano obtido pela técnica de difusão em disco observado para o óleo em relação ao extrato frente a *S. aureus* foi 1,3 vezes superior enquanto para *B. subtilis* foi 1,4 vezes. Nesse estudo de Salvagnini et al (2008), o extrato de uma planta da família Myrtaceae foi mais efetivo no controle de bactérias Gram-positivas, corroborando com os resultados encontrados para o extrato de araçáúna e suas frações. Para Simões et al (2002) e Costa (1994), os resultados podem ser derivados da anulação enzimática que extratos vegetais causam diretamente na membrana dos micro-organismos ou até mesmo por uma competição por íons metálicos, que são essenciais para o metabolismo microbiano, afirmando que esses extratos vegetais conferem propriedades antissépticas.

Em 2005, Gonçalves e colaboradores, comprovou um resultado positivo em um estudo na inibição de *S. aureus* com extrato de *P. guajava* (goiabeira), apresentando halos em média de 25 mm. Já Alves et al (2006) procurou provar que o extrato vegetal de *P. guajava* é eficaz contra diversas cepas de leveduras do gênero *Candida*, conseguindo resultados animadores em atividade antifúngica derivada do extrato, onde apresentou halos de 22 mm para extrato bruto. Amancio et al (2015), em uma mesma linha de pesquisa apresentou dados mostrando a ação inibitória da goiabeira para *E. coli* (ATCC 25922) com halos de 10mm, 9mm, 0mm e 6mm e *S. aureus* (ATCC 6538) 24mm, 23mm, 16mm e 21mm. Amancio et al (2015) ainda faz a relação entre os resultados obtidos com o alto teor de substâncias como óleos essenciais, taninos e compostos fenólicos na atividade antimicrobiana observada por essa espécie vegetal e por outras espécies pertencentes à família *Myrtaceae*.

A Figura 4 representa os testes de inibição realizados nesse trabalho.

Figura 4: Halos de inibição da fração hexano e do extrato bruto contra *S. aureus* (cepa FP). (A) Fração hexano; (B) Extrato bruto.



Fonte: Autor

Devido a esses resultados, o EB foi selecionado para o teste de inibição de bactérias no pescado, pois não diferiu significativamente das frações hexano e metanol, além de ter apresentado o melhor rendimento quando extraído da folha de araçauína. A fração resultante da cromatografia líquida à vácuo com água não foi testada, pois ocorreu a contaminação por fungos. Os testes de inibição com o grupo controle, comprovaram que os solventes, em sua forma pura sem o extrato, foram evaporados com eficiência, não interferindo nos testes de inibição do patógeno. Fato também confirmado por Nascimento (2018), em testes de controle microbiano de pescado com extratos etanólicos de macroalgas.

No presente estudo, não foram reconhecidos os aspectos ecológicos da planta estudada, impedindo dados da influência acerca da sazonalidade do EB. Logo, é possível, que a depender da estação do ano, extratos que não obtiveram resultados positivos nos testes de inibição, possam ser eficazes contra os patógenos testados.

### 6.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para os testes de controle bacteriano no pescado, foi escolhida a cepa de *S. aureus* isolada de linguiça de peixe, por ser mais facilmente reconhecida, devido à sua morfologia hexagonal. Assim, foi determinada a CIM do EB, no controle dessa cepa.

Os resultados demonstraram que a CIM do EB da folha de araquá, no controle de *S. aureus* (cepa FP), está entre 3,1 e 6,2 mg/mL, pois as concentrações de 1250, 2500 e 5000 µg a cada 200 µL inibiram o crescimento do patógeno. Em trabalhos utilizando *P. cattleyanum*, as concentrações dos extratos variaram entre 150 e 500 µg/mL (ALVAREDA et al, 2015), sendo que no presente estudo, o valor de CIM foi muito superior. Ao testarem a atividade antimicrobiana de diversos extratos etanólicos e óleos essenciais contra *S. aureus* e *E. coli*, Silva et al (2012) relatam que a CIM contra o patógeno *S.aureus* se estabeleceu na concentração de 2,2 mg/mL para o extrato etanólico e do óleo essencial, na mesma concentração contra *E. coli*. Explicam os autores que todos os compostos encontrados no estudo estão envolvidos com a propriedade antimicrobiana, sendo ele os terpenoides nos extratos etanólicos e os fenóis nos óleos essenciais. Já Santos et al (2015) relata que para *P. platycephala* a CIM e a Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato vegetal apresentou-se em 12,5 mg/mL para *S. aureus*. Vários estudos confirmam os resultados encontrados neste trabalho sobre maior sensibilidade de *S. aureus* aos extratos vegetais (SILVA, 2007; SILVA, 2010; ARAÚJO et al., 2015).

A CIM realizada teve por objetivo encontrar a menor concentração do EB como um agente antimicrobiano, visando a necessidade de inibição do crescimento visível da bactéria testada. O sucesso da atividade antimicrobiana de um extrato, comumente quantificada pela determinação dos valores de CIM, podem oferecer uma base para um tratamento e conservação de alimentos em maior escala.

O EB mostra-se munido de uma gama de potenciais antimicrobianos, não só por este estudo, mas outros já desenvolvidos com resultados positivos obtidos a partir do EB,

no Laboratório de Ecologia Microbiana do Ifes – Campus Piúma. Com a purificação do(s) princípio(s) ativo que possui a atividade antimicrobiana, a CIM tende a diminuir. Podendo ser considerado um recurso promissor e inovador, natural, que tem potencial para ser utilizado no lugar dos conservantes e antibacterianos industriais, visando sua utilização na indústria alimentícia e farmacêutica.

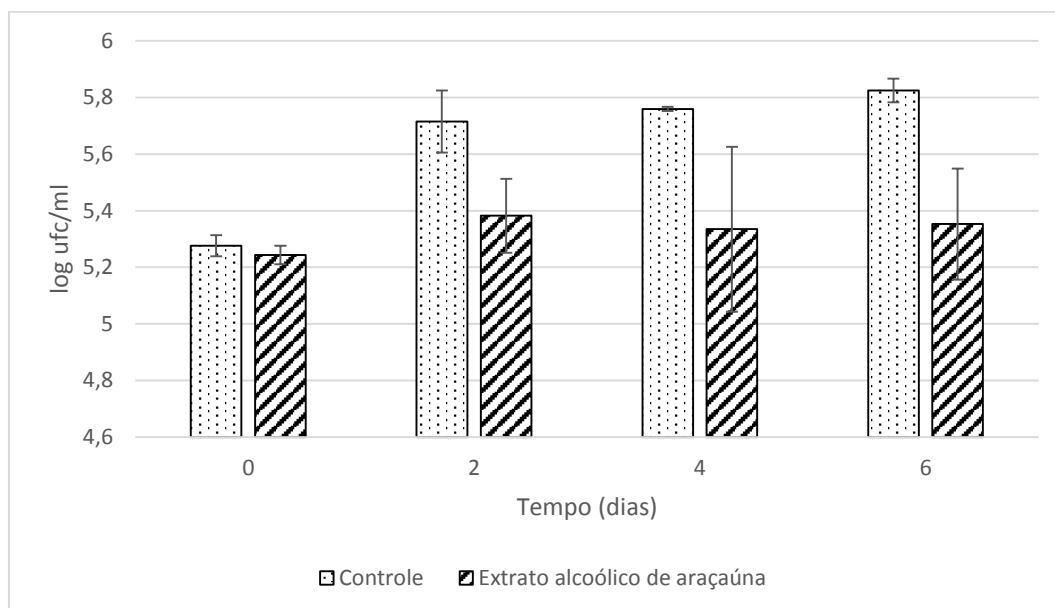
## 6.4 ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO DO PESCADO

### 6.4.1 Análise de estafilococos

Para a análise da ação do EB na conservação do pescado, inoculou-se uma suspensão da cepa FP ( $10^6$  UFC/mL) nos filés de peróá. A caracterização dessa cepa bacteriana permitiu definir quais as bactérias que haviam sido inoculadas artificialmente no pescado e quais eram as bactérias naturais. Essa caracterização foi importante, pois a cepa inoculada é comprovadamente sensível ao EB, sendo assim a eficácia do extrato pode ser analisada com mais rigor.

Podemos observar na figura 5 uma comparação entre a quantidade de *S. aureus* presente no controle e na amostra contendo o EB de folhas de arcaúna durante os dias de experimento. No tempo zero, assim que as amostras foram inoculadas, observa-se a homogeneidade entre a quantidade de bactérias presentes no controle e no tratamento com o EB, não havendo diferença significativa. Após o segundo dia de experimento, ocorre uma grande proliferação de bactérias nos tratamentos controle e, uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) nas amostras tratadas com o EB. Isso demonstra que o EB, quando aplicado ao pescado, demonstrou atividade antimicrobiana, inibindo o desenvolvimento do *S. aureus*.

Figura 5: *Staphylococcus aureus* presentes nas amostras sob refrigeração (Log10).



\*letras iguais nas colunas agrupadas não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,01$ )

Fonte: Autor.

Gonçalves e colaboradores (2005) mostraram que a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da pitanga sobre as cepas de *E.coli*, *S.aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Providencia spp* e *Shigella sonnei*, conseguindo inibir principalmente o *S. aureus*. A intoxicação estafilocócica é uma das causas mais frequente relacionadas aos surtos de doenças microbianas transmitidas por alimentos, em muitos países. Surtos e casos esporádicos de intoxicação atribuídos ao consumo de pescado e alimentos lácteos tem sido relatado em vários países, conseqüentemente a busca para o combate contra esse patógena com recursos naturais vem se aprofundando (CARMO et al., 2002; INPPAZ/OPS/OMS, 2006). Estes resultados, comparados aos resultados obtidos nesta pesquisa, possibilitam considerar que a araçáúna, espécie de mesma família da pitanga, apresenta um potencial antimicrobiano que merece uma ênfase maior entre as várias plantas estudadas até os dias de hoje.

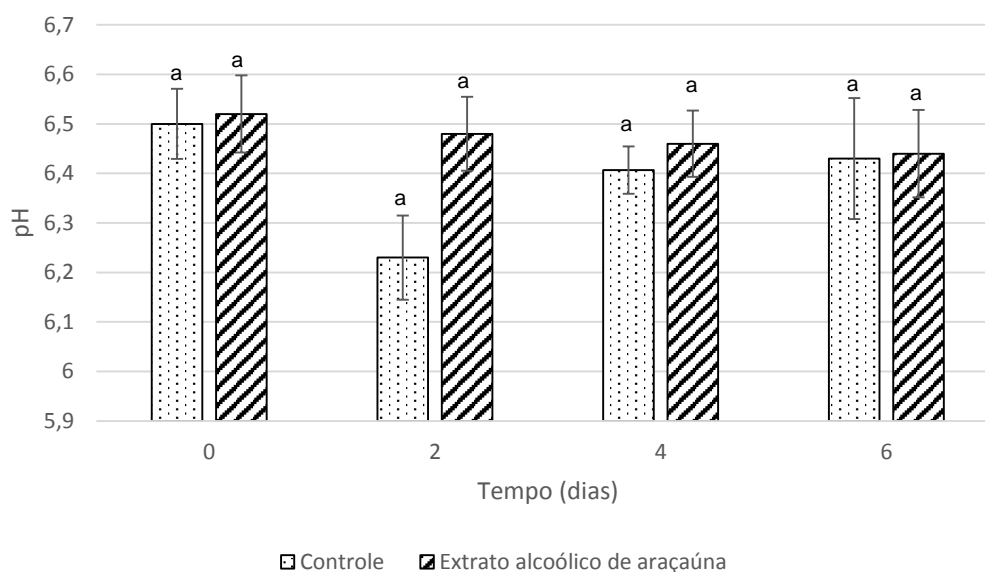
#### 6.4.2 pH e atividade de água

Fazendo referência ao pH, a legislação brasileira estabelece valores máximos de 6,5 e 6,8 para as musculaturas interna e externa dos peixes, respectivamente, mas o pH sozinho não é um índice seguro para avaliar o estado de frescor do peixe, e por isso

seu uso geralmente é restrito por variar de amostra para amostra, ou faz-se a junção de outros métodos junto ao pH (BRASIL, 1997; BRASIL, 1952).

A figura 6 mostra que o pH não apresenta diferenças significativas entre amostras e o controle ao longo dos dias, mostrando-se dentro dos padrões, respeitando valores estabelecidos de pH para a carne de pescado. O aumento do pH no músculo do pescado pode ser ocasionado perante ao acúmulo de produtos de natureza básica, como trimetilamina (TMA), demetilamina (DMA), indol, escatol e algumas bases orgânicas, como putrescina e cadaverina, produzidas pela hidrólise bacteriana de compostos hidrogenados (SOCCOL, 2002). De uma forma geral, quando o rigor mortis se inicia, o pH do peixe cai de 7,0 para 6,5 subindo rapidamente a níveis de 6,6 a 6,8, sendo caracterizada como uma queda rápida de pH mas dependente das condições de pesca, tal que este fator depende da resistência que os peixes opõem à captura (SOARES et al, 1998).

Figura 6: pH das amostras sob refrigeração ao longo dos dias.



\*letras iguais nas colunas agrupadas não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ )

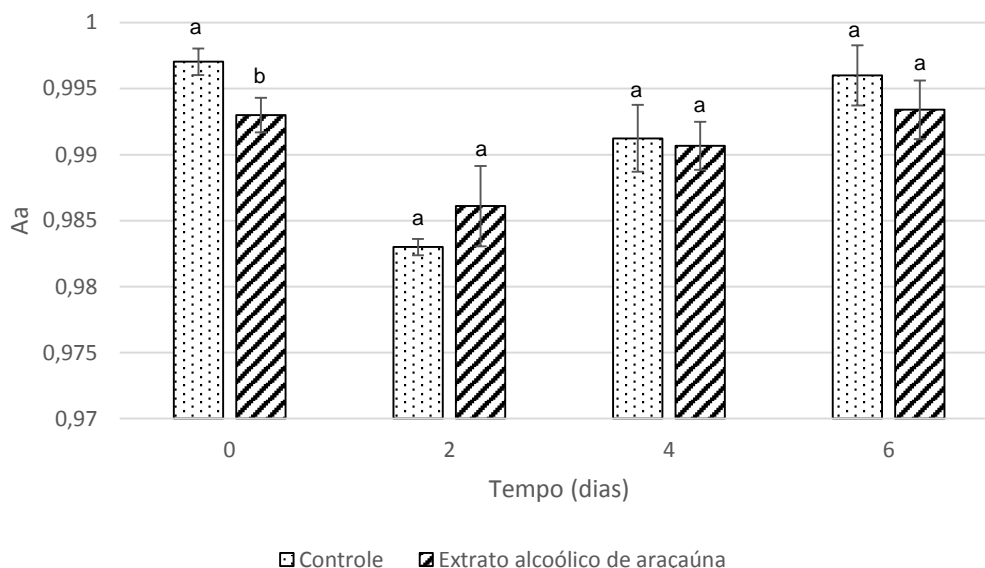
Fonte: Autor.

Para a atividade de água (Figura 7), a média resultante dos valores para o controle e amostras ao longo dos dias foi de 0,99, apresentando diferença significativa apenas no dia 0 entre as duas amostras, que foi o mesmo valor encontrado por Gomide (2005) para peixe fresco em um estudo da qualidade física, química e microbiológica de filés



de piracanjuba, o que é correspondente ao valor de atividade de água estabelecido para carne de peixe fresco.

Figura 7: Teor de atividade de água nas amostras analisadas sob refrigeração.



\*letras iguais nas colunas agrupadas não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Fonte: Autor.

O pH e Aa são fatores extremantes importantes para a proliferação de micro-organismos. É sabido que, a carne do pescado é altamente constituído por água e, seu pH pode beneficiar o crescimento de patógenos, juntos são considerados fatores que favorecem o crescimento de micro-organismos, aumentando sua exteriorização (Ribeiro e Saravalli, 2004).

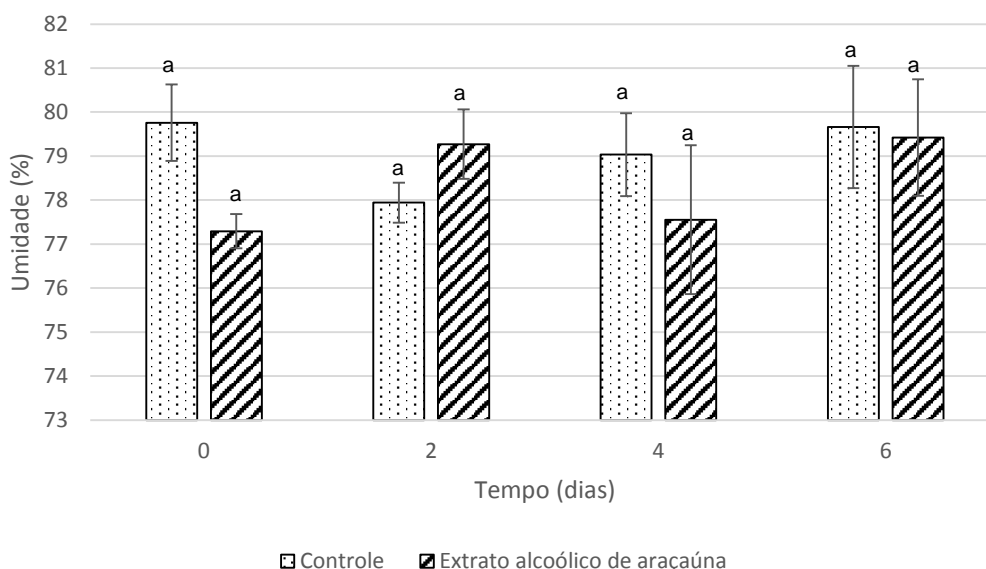
#### 6.4.3 Umidade

Os resultados médios obtidos de umidade (Figura 8), entre os dias de inóculo para os controles, apresentaram-se em torno dos 79,09% e para as amostras 78,38%. Os dados apresentados na figura mostram que não houve uma variação significativa entre as amostras analisadas a partir do segundo dia de inoculação, apresentando uma variação entre amostra e tratamento apenas no dia 0 que chegou a um alto teor de umidade, mas que pode ser explicado pela adição de 1 mL de líquido de suspensão bacteriana no controle e 2 mL de líquido numa mistura de diluição de extrato e suspensão bacteriana. Além disso, os resultados obtidos foram próximos aos encontrados por Yanar et al. (2006) em estudos sobre tilápia, que apresentou uma

média 76,87% de umidade. Estes resultados também concordam com os encontrados por Sales e Sales (1990) para tilápia, que apresentaram valores médios de 75% de umidade. Já Caula et. al. (2008), em estudo sobre teor de colesterol e composição centesimal de algumas espécies de peixes do estado do Ceará encontrou médias de umidade de 80,7% para o pargo e 80,2% para a tilápia.

As diferenças entre umidade, mesmo que sejam significativas ou não, podem ser explicadas pelo tipo de peixe estudado, sazonalidade, tipo de armazenamento proporcionado, entre outros fatores que podem alterar a composição de umidade do pescado.

Figura 8: Teor de umidade das amostras sob refrigeração.



\*letras iguais nas colunas agrupadas não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Fonte: Autor.

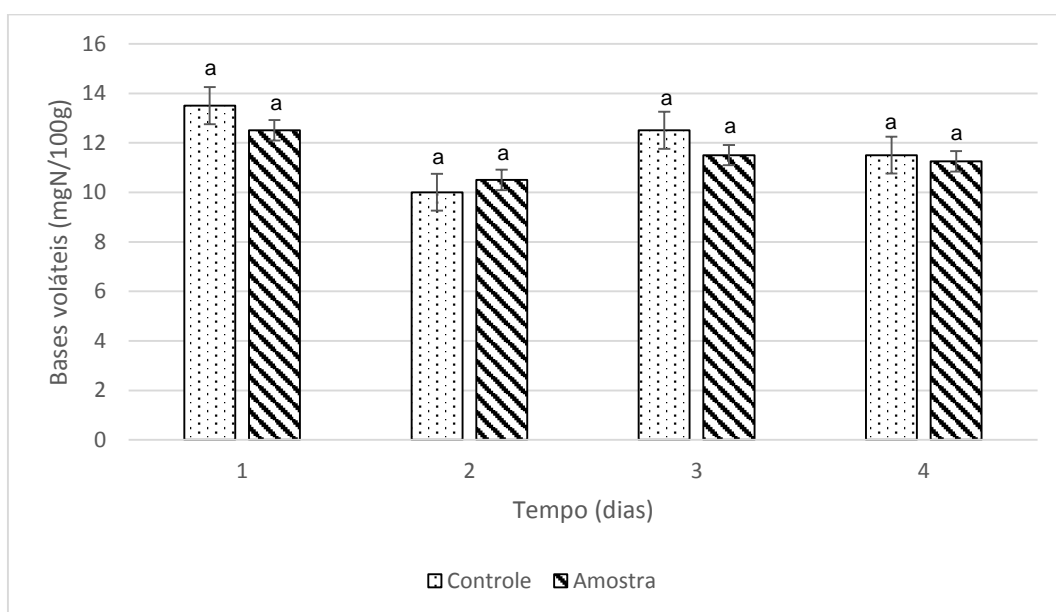
#### 6.4.4 Bases voláteis

O presente método de avaliação baseia-se na destilação por arraste de vapor da amônia e das aminas voláteis que estão presentes no pescado, em meio levemente alcalino, procedendo-se de uma titulação com solução ácida para sua quantificação e assim estabelecer um grau de frescor para a carne do peixe.

Segundo Brasil (1952) e Brasil (1997) o teor aceitável de BVT é de 30mgN/100g, mas este valor é diferenciado para os elasmobrânquios, como os cações, onde a mensuração desses compostos não serve como parâmetro de qualidade. Perante isso

todas as amostras avaliadas quanto a mensuração de BVT apresentaram-se dentro do valor admissível para consumo, não indicando diferenças significativas entre si, mostrando-se ser uma carne apta para ser consumida na alimentação humana (Figura 9). Rodrigues et al (2012) apresenta resultados médios de BVT que variaram entre 9,43 e 12,37 mg N-BVT/100g, estando todas as amostras dentro dos limites preconizados pela legislação em um estudo da qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro.

Figura 9: Mensuração do teor Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (mg/100g).



\*letras iguais nas colunas agrupadas não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Fonte: Autor.

#### 6.4.5 Análise sensorial

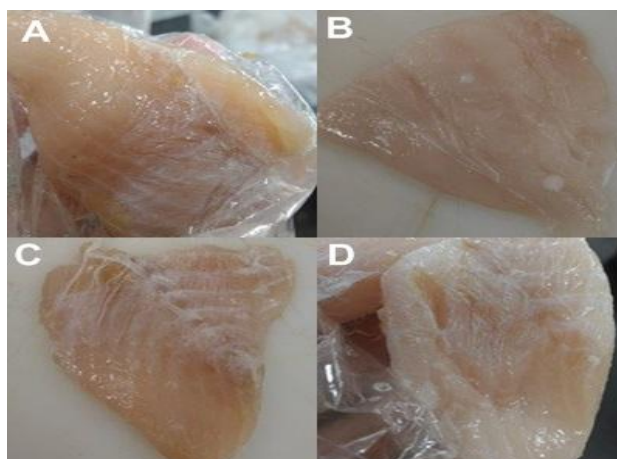
Segundo Oetterer (2002), um peixe fresco é aquele que possui características sensoriais bem definidas, que proporcionam maior aceitação pelo consumidor. A análise sensorial é utilizada para avaliar o frescor dos alimentos, como o pescado, levando em conta aspectos sensoriais como coloração e aparência (RODAS et al, 2004). Com base nas alterações que mais caracterizam a deterioração em peixes estão relacionadas principalmente a alterações sensoriais, a análise sensorial é o principal método de avaliação do frescor em peixes em testes rápidos. É um dos métodos mais antigos e usuais empregados em indústrias para a avaliação da qualidade e frescor do peixe (GONÇALVES, 2011).

A inspeção sanitária em vigor do pescado, baseia-se, principalmente, em observações sensoriais, privilegiando a visão, o tato e o olfato e verificando a apresentação, o aspecto, a consistência, a resistência e o odor ou cheiro (PRATA, 1999).

Para o dia zero, o filé de peróá analisado apresentou-se com odor característico de peixe fresco, textura resistente, mostrando características de um peixe fresco para ambos testes, controle e amostra (Figura 10 e 11). No dia 2, os filés ainda se apresentam com características de peixe fresco, mantendo-se estáveis, porém a amostra contendo o EB começa a exalar cheiro do extrato. No 4º dia, as amostras se apresentam semelhantes ao dia 2 (Figura 10 e 11). Em 6 dias, as amostras apresentavam-se com odor leve característico de amônia para o controle e, para o tratamento que continha o EB, odor semelhante ao do extrato, sendo que para o controle a carne continha resistência comprometida (mole), aparência opaca, já para a amostra a resistência da carne apresentou com um grau mais ameno, odor suave, aparentando um filé de peixe aparentemente fresco (Figura 10 e 11).

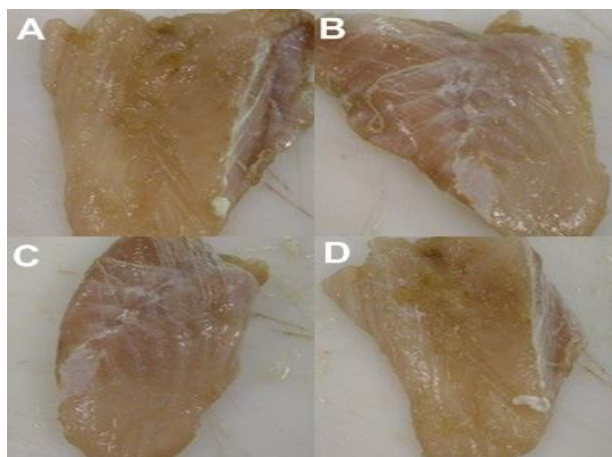
Os controles foram obtendo uma degradação contínua em suas características sensoriais, o que pode ser explicado ausência do EB, não havendo controle sobre a replicação da bactéria *S. aureus*, aumentando sua quantidade e causando a deterioração no filé. As amostras que continham o patógeno junto com o EB aparentou ser um pouco mais conservado, devido à inibição da proliferação bacteriana.

Figura 10: Controles dos filés com suspensão bacteriana. (A) Dia 0; (B) Dia 2; (C) Dia 4; (D) Dia 6.



Fonte: Autor.

Figura 11: Tratamento dos filés com extrato bruto e suspensão bacteriana. (A) Dia 0; (B) Dia 2; (C) Dia 4; (D) Dia 6.



Fonte: Autor.

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que as folhas de araçauína (*Psidium* sp.) possuem compostos bioativos com potencial antibacteriano em seu extrato etanólico bruto.

Das bactérias testadas, a espécie patogênica *Staphylococcus aureus*, que também é deterioradora do pescado, foi o mais sensível ao extrato bruto das folhas de araçauína.

O extrato obtido de folhas araçauína diminuiu significativamente ( $p < 0,01$ ) o número de *S. aureus* no pescado. Assim, pode ser considerado um potencial candidato a conservante natural do pescado, podendo substituir os conservantes químicos, proporcionando não apenas benefício nutricional, mas também biotecnológico e industrial.

Faz-se necessário o estudo aprofundado e criterioso deste antimicrobiano natural, para determinar o nível de citotoxicidade e mutagenicidade em células animais. Além disso, o isolamento do princípio ativo será importante para verificar se a pigmentação observada está associada à atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

- AGENTA, F. F. **Tecnologia do pescado: características e processamento da matéria-prima**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2012. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/40077/000827108.pdf?se>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- AGRA, M. F; SILVA. K.N, BASÍLIO. I. J. L. D; FREITAS. P. F; BARBOSA-FILHO. J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300023>. Acesso em: 15 de nov. 2019.
- ALMEIDA, A.M.S. **Características biológicas e antigênicas de escherichia coli com ênfase aos genes de virulência**. Universidade de Goiás, Goiânia. 30p., 2013.
- ALVARENDA, F.Q; ROYO, V.A.; MOTA, B.F.C.; LAURENTIZ, R.S; MENEZES, E.V; MELO JUNIOR, A.F; OLIVEIRA, D.A. **Atividade Antinociceptiva e Antimicrobiana da Casca do Caule de Psidium Cattleyanum Sabine** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1125-1133, 2015.
- ALVES, P.M; LEITE, P.H.A.S; PEREIRA, J.V; PEREIRA, L.F; PEIREIRA, M.S.V; HIGINO, J.S; LIMA, E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Rev. bras. farmcogn.** vol.16 n.2 João Pessoa Abr/Jun 2006.
- AMANCIO, A.M; REIS, L.O; PEREIRA, J.B.B; LUCIA, M; MALAQUIAS, L.C.C; CHAVASCO, J.K. Estudo da ação antimicrobiana de extratos de Plantas do gênero *Psyidium*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 644-652, 2015.
- ARAÚJO, E. R. D.; OLIVEIRA, D. C.; SOARES, T. C.; LANGASSNER, S. M. Z.; TAVARES, J. C. M.; SILVA, D. G. K. C. **Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie Anadenanthera colubrina frente a bactérias gram negativa e gram positiva**. Biota Amazônia, v. 5, n. 3, p. 66-71, 2015.
- BAIANO, A.; DEL NOBILE, M. A. **Antioxidant compounds from vegetable matrices: Biosynthesis, occurrence, and extraction systems**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, New York, v. 56, n. 12, p. 2053-2068, 2016.
- BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de Salmonella entérica Sorovar typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande Do Sul**. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias).145f., 2006.
- BRASIL. **Manual Técnico de diagnóstico de Salmonella spp**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília. 64p., 2011.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei n. 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1952.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 185, de 13 de maio de 1997: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado).** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 15 mai 1997. Seção I, n. 158. p. 102-8.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 185, de 13 de Maio de 1997.** Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 Maio 1997. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-185-de-13-05-1997,670.html>. Acesso em: 22 nov. 2013.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Cary, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838798>. Acesso em: 23 nov. 2019.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

CABRAL, I.S.R. **Extratos de algas marinhas como agente antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de Mincend de tilápia (*Oreochromis niloticus*).** Dissertação (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo. 139 p., 2012.

CALO JR, CRANDALL PG, O'BRYAN CA, RICKE SC. **Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems – A Review.** Food Control (2015) 54:111–119.

CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V.M. **Toxinfecção alimentar por *Salmonella spp.*** Revista do Instituto Ciências e Saúde, São Paulo. 24(2):95-101. 2006.

CARMO, L.S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, n.1, p.9- 14, 2002.

CAULA,F.C.B.; OLIVEIRA,MP.; MAIA,E.L. **Teor de colesterol e composição centesimal de algumas espécies de peixes do estado do Ceará.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(4): 959-963, out.-dez. 2008.

CELESTINO, S.M.C. Princípios da secagem de alimentos. **Embrapa Cerrado, Planaltina – DF.** 1ª Ed., 40p., 2010.

CERESINO, E.B. **Araçáua: Fonte não explorada de pigmentos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012, 69f.



CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2017. **Preventing Food Poisoning**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/prevention.html>. Acesso em: 06 out. 2019.

CINTRA, P. **Métodos de conservação de alimentos**. Disponível em: <https://nutrisaude14.files.wordpress.com/2014/11/mc3a9todos-de-conservac3a30-dos-alimentos-2014.pdf>. Data de acesso: 11 nov. 2019.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. 1031 p.

COUTINHO, I.D.; KATAOKA, V.M.; HONDA, N.K.; COELHO, R.G. VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. *Myrtaceae*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 322-327, 2010.

CUNHA, C.D. **avaliação de fitoquímicos e das atividades antioxidante celular e antiproliferativa do suco de araçá-una** (*Psidium eugeniaefolia*) e araçá morango (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) - Alfenas, MG, 2014.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. Métodos químicos para análise de pescado. In: KAI, M.; RUIVO, U. E. (Coord.). **Controle de qualidade de pescado**: seminário sobre controle de qualidade na indústria de pescado. Santos: Loyola, 1988. 303 p.

DACK, G. M. **Food poisoning**. Chicago, University of Chicago. 3<sup>o</sup> ed. p.109-58, 1964.

DANNENBERG, G. da S.; FUNCK, G. D.; MATTEI, F. J.; SILVA, W. P. da; FIORENTINI, Â. M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius Raddi*) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 120–127, 2016.

DANNENBERG, G. S. **Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*): atividade antimicrobiana e aplicação como componente ativo em filme para bioconservação de alimentos**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017, 121f.

DIONYSIO, R.B.; MEIRELLES, F.V.P. **Conservação de alimentos**. PUC, Rio de Janeiro. 15p., 2017.

DONADIO, L.C. Jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg). In: **Frutas Brasileiras**. DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 288 p.

EGEA, M. B; PEREIRA-NET, A.B; CACHO, J; FERREIRA, V; LOPEZ R. Comparative analysis of aroma compounds and sensorial features of strawberry and lemon guavas (*Psidium cattleianum Sabine*). **Food Chemistry, Amsterdam**, v. 164, p. 272-277, 2014.

FABIANE, K.C. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos vegetais de folhas de espécies nativas de Myrtaceae**. Pato Branco, 2019. 66 f.

FARIA, R.C.B. **Resistências a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus***. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). 2008, 48 p.

FERREIRA, M.W.; SILVA, V.K.; BRESSAN, M.C.; FARIA, P.B.; VIEIRA, J.O.; ODA, S.H.I. **Pescados processados: maior vida de prateleira e maior vida agregada**. UFLA – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 22 p., 2009.

FERREIRA W. F., SOUSA J. C. **Microbiologia**. Lidel - Edições Técnicas, Lda. v. 2, 2000.

FRANCOIS, P.; BENTO, M.; RENXI, G.; HERBARTH, S.; PITTET, D.; SCHRENZEL; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humano**. São Paulo: Varela, 2003. 653 p.

GABRIEL, A.S.G.S.F. **Biotechnologia: concepção e validação de trabalhos práticos**. Universidade de Aveiro. Portugal. 2012.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; GAVA J. R. F. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GOMIDE, C.A. **Estudos da qualidade física, química e microbiológica de filés de piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849) submetidos à salga seca e úmida**. (Monografia). Universidade Federal de São Paulo. Pirassununga – SP, 2005.

GONÇALVES A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H. **Comparative study on antimicrobial activity of some native tree extracts**. Arquivos Instituto de Biologia. 72, p.353-358, 2005.

GONÇALVES A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu; 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine, Kidlington**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HAMINIUK, C. W. I., SIERAKOWSKI, M. R., VIDAL, J. R. M. B., & MASSON, M. L. Influence of temperature on the rheological behavior of whole araca pulp (*Psidium cattleianum* Sabine). **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n 4, 426–430, 2006.

IARIA, S. T.; FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. Pesquisa De *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais. **Revista Saúde pública, São Paulo**, v.14, 93-100, 1980.

(INPPAZ) INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS Y ZONOSIS / ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DELA SALUDE (OMS). **Vigilancia epidemiológica. Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos (SIRVETA)**. 2006.

JACQUES, A. C., J. **Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillinresistant *Staphylococcus aureus***. J Clin Microbiol. 45 p. 2007.

JACQUES, A. C., PERTUZATTI, P. B., BARCIA, M. T., & ZAMBIAZI, R. C. Bioactive compounds in small fruits cultivated in the southern region of Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, 123–127, 2009.

JARDIM, E.C; JARDIM JÚNIOR, E.G; SCHWEITZER, C.M; OKAMOTO, A.C. Atividade inibitória do verniz de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) sobre amostras de *Streptococcus mutans* “in vitro”. **Arch Health Invest**. (2015) v. 4, n. 6: p. 54-60 2015 - ISSN 2317-3009. 2015.

JUNIOR, A.F. ***Pseudomonas aeruginosa***. UNESP: Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu. 56p., 2006.

KALT, W. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science, Hoboken**, v. 70, n. 1, p. 11-19, 2005.

KATALINIC, V., MOZINA, S. S., SKROZA, D., GENERALIC, I., ABRAMOVIC, H., MILOŠ, M.,. **Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia)**. Food Chemistry, 119(2), 715–723, 2010.

LAROZE, L.; ZÚÑIGA, M. E.; SOTO, C. Raspberry phenolic antioxidants extraction. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 136, p. 717–742, 2008.

LEONARDI, J.G.; AZEVEDO, B.M. **Métodos de conservação de alimentos**. Revista Saúde em Foco. 10ª Edição, 2018.

LINK, A., BALAGUER, F., GOEL, A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1771-92, 2010.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura***. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p..

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas Nativas do Brasil**. 5 edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MARQUES, L. A. **Conservação dos alimentos**. Universidade de Évora, Portugal. 3p., 2001.

MARIN, R, APEL, M.A; LIMBERG, R.P; ZUANAZZI, S; HENRIQUES, T. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 27, p. 172- 177, 2008.

MELO, A.P.C.; SELEGUINI, A.; VELOSO, V.R.S. “Caracterização física e química de frutos de araçá (*Psidium guineense* Swartz)”. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 91-95. 2013.

MOHAMMAD AZMIN, S. N. H. MAMAN, Z.A; ALWI, S.R.W; MUSTAFFA, A.A; SUAN, L; YUNUS, N.A. Herbal processing and extraction technologies. **Separation and Purification Reviews**, New York, v. 45, n. 4, p. 305-320, 2016.

MORAIS, L. M. F; CONCEIÇÃO G. M; NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **AGRARIAN ACADEMY**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.1, n.01; p.317. 2014.

MÜLLER, N.T.G.; FASOLO, D.; BERTÊ, R. ELY, C.V.; HOLZ, D.T. Análise fito química das folhas de Myrtaceae: *Psidium cattleianum* Sabine e *Campomanesia guazumaefolia* (Camb.) **Berg. Vivências**, v. 8, n. 14, p. 65 71, 2012.

NASCIMENTO, C.B. **Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de macroalgas marinhas e sua aplicação no controle de contaminantes do pescado**. Monografia (Bacharelado em engenharia de Pesca) - Instituto Federal do Espírito Santo, Piúma, 2018.

NATARRO, H.W.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinica Microbiológica**. V. 11, p. 142-201. 1998.

NBR ISO 6888-1 de 06/2019. **Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal - Método horizontal para enumeração de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies)** - Parte 1: Técnica usando ágar Baird-Parker, Junho de 2019.

NESPOLO, C. R. **Práticas em tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2015.

NUNN, J. F. **Ancient Egyptian Medicine**. Oklahoma City: University of Oklahoma Press/Red River Books, 2002.

OLIVEIRA, A.P.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; MOREIRA, N.M.; OLIVEIRA, J.J. *Salmonella entérica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiania, v.9, N.16, 26p., 2013.

OLIVEIRA, N.N.S.; VIANA, A.P.; QUINTAL, S.S.R.; PAIVA, C.L.; MARINHO, C.S. 2014. “Análise de distância genética entre acessos do gênero *Psidium* via marcadores issr”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 4, p. 917-923, 2014.

OZEN, T.; DEMIRTAS, I.; AKSIT, H. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpillii* var. *skorpillii*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 58-64, 2011.

PACHECO, R.L. **Avaliação da disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina em serviço de dermatologia do hospital das clínicas**. Universidade De São Paulo, São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências). 81 p. 2008.

PEREIRA, M. C., STEFFENS, R. S., JABLONSKI, A., HERTZ, P. F., DE O. RIOS, A., VIVIZZOTTO, M., FLZZOTTO, M., FLÔRES, S. H. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae familyfruits from the Myrtaceae family.

**Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061-3067, 2012.

PRATA LF. **Higiene e inspeção de carnes, pescado e derivados**. São Paulo: Unesp; 1999.

RODAS M.A.B; TAVARES M; MARSIGLIA D.A.P. Avaliação das características sensoriais de alimentos sob o ângulo da legislação brasileira. **Bol Inst Adolfo Lutz**, v.14, n.1/2, p. 5-7, 2004.

RODRIGUES, B.L; SANTOS, R; MARSICO, E.T; CAMARINHA, C.C; MANO, S.B; JUNIOR, C.A.C. Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, set./out. 2012.

SALES, R. de O., SALES, A. M.; Estudo da composição química e rendimento de dez espécies de água doce de interesse comercial nos açudes do nordeste brasileiro. **Ciências Agronômicas**. v. 1, n. 21, p. 27-30, 1990.

SALVAGNINI, L.E; OLIVEIRA, J.R.S; LUIS SANTOS. E; MOREIRA, R.R.D; ROSEMEIRE PIETRO. CR.L. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Rev. bras. farmacogn.** vol.18, n. 2 João Pessoa Abr./Jun, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. **Biodisponibilidad y metabolismo**. Alimentaria, Mexico City, n. 329, p. 19-27, 2002.

SANTIAGO, J.A.S.; ARAÚJO, P.F.R.; SANTIAGO, A.P.; CARVALHO, F.C.T.C.; VIEIRA, R.H.S.F. bactérias patogênicas relacionadas a ingestão de pescados - revisão. **LABOMAR – Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza. v. 4, n. 2. p. 92-103. 2013.

SANTOS A.T.B.; ARAÚJO T.F; NASCIMENTO DA SILVA L.C.; DA SILVA C.B.; DE OLIVEIRA A.F; ARAÚJO J.M; CORREIA M.T; LIMA V.L. Organic extracts from *Indigofera suffruticosa* leaves have antimicrobial and synergic actions with erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Recife, Brazil: Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1, 2015.

SANTOS, M.M.S. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de plantas medicinais sobre patógenos de origem alimentar (Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Salmonella Typhimurium)**. Universidade Federal Do Tocantins Programa de Pós-Graduação em Ciência E Tecnologia De Alimentos, Palmas -TC, 2016.

SANTOS, S. F.; NOVALES, M. G. **Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents**. **Current in Opinion Biotechnology**, n. 23, p.136–141, 2012.

SANTURIO, F. D. **Uso de óleos essenciais de especiarias para controle de coliformes em lingüiça toscana**. 2015, 62f. Tese (Doutorado em Ciência e

Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, p. 979-990, 2012.

SILVA, M. L.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 208-214, 2008.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 632 p.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate**. São Paulo. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2012.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oil from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1510–1514, 2012.

SILVA, B. V.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 50, p. 144-158, 2016.

SILVEIRA, D.R.; MILAN, C.; ROSA, J.V.; TIMM, C.D. Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. e importância em doenças transmitidas por alimentos. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 83, n. 7, 2016.

SIM, C. C.; KUMARESAN, S.; SARMIDI, M. R. Mass transfer coefficients of *Eurycoma longifolia* batch extraction process. In: **Proc. 18th Symposium of Malaysian Chemical Engineers**. 2004. p. 362-367.

SIMÕES, C. M. ET AL; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO J.C.P; MENTZ L. A; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: UFSC, 2002. 798p.

SOARES, V. F. M VALE S. R., JUNQUEIRA, R. G., GLÓRIA, M. B. Teores de histamina e qualidade físico - química e sensorial de filé de peixe congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 4. Campinas, 1998.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 10 de jan. 2014.

SOCCOL, Marcilene Camilo Heidmann. **Otimização da vida útil da Tilápia (*Oreochromis niloticus*) minimamente processada e armazenada sob refrigeração**. Piracicaba, 2002. 124 f. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

SPAGO, F. R.; ISHII MAURO, C. S.; OLIVEIRA, A. G.; BERANGER, J. P. O.; CELY, M. V. T.; STANGANELLI, M. M.; SIMIONATO, A. S.; SAN MARTIN, J. A. B.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**, v. 62, p. 46-54, 2014.

VIEIRA, R.F.; COSTA, T.S.A.; SILVA, D.B.; FERREIRA, F.R.; SANO, S. M. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2006. P. 42-62.

VIEIRA, R.H. S. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Livraria Varela, 380 p., 2003.

WHO (World Health Organization): **WHO traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva, WHO 2002.

YANAR Y.; CELIK, M.; AKAMCA, E. Effects of brine concentration on shelf-life of hot-smoked tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored at 4 °C. **Food Chemistry**. v. 97, n. 2 p. 244– 247, 2006.