INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CAMPUS PIÚMA
CURSO SUPERIOR EM ENGENHARIA DE PESCA

EMILLY FERNANDES BAYLET

EFICIÊNCIA DE EXTRATOS DE *Psidium myrtoides* NO CONTROLE DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DO PESCADO

PIÚMA - ES
2021

EMILLY FERNANDES BAYLET

EFICIÊNCIA DE EXTRATOS DE *Psidium myrtoides* NO CONTROLE DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES 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: Profª. Drª. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves.

PIÚMA - ES

2021

Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP)
Bibliotecária responsável Ana Muller CRB6/ES 541

B358e Baylet, Emilly Fernandes, 1999-

Eficiência de extratos de *Psidium myrtoides* no controle de bactérias contaminantes do pescado / Emilly Fernandes Baylet. -- 2021.

73 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, 2021.

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

CDD: 664.001579

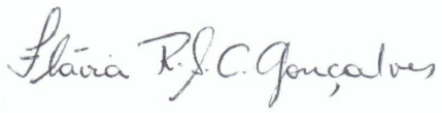
EMILLY FERNANDES BAYLET

EFICIÊNCIA DE EXTRATOS DE *Psidium myrtoides* NO CONTROLE DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES 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.

Aprovado em 25 de março de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profª. Drª. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves
Instituto Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Giordani Minozzo
Instituto Federal do Espírito Santo

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

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradecer a Deus, pela força e amparo em todos os momentos de minha vida, pois sem Ele nada seria possível.

A minha família, por todo amor, apoio, sabedoria, exemplos de vida e de fé, por todos os conselhos e estímulos, minha eterna gratidão!

A minha orientadora Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves, por todos os ensinamentos passados, apoio e confiança depositados em mim ao longo dos anos de estudo e principalmente por ter aceito me orientar neste trabalho tão marcante em minha vida.

Agradecimento especial ao Paulo Vinícius e sua família, por tudo que fizeram por mim nesses anos, pelo apoio, cuidado, amor, momentos felizes e acolhimento recebido.

A minha amiga Naessa por todos os dias em que me apoiou e ajudou, sempre prestativa, paciente e bem humorada, aos meus amigos Savyo, Nathan e Ananda, pelo apoio em todos os momentos, principalmente quando eu mais precisei, pelas conversas, socorros e pelas aventuras e as minhas amigas Laura, Roberta e Caroline, por todo cuidado, ensinamentos, paciência e momentos compartilhados.

Agradecer aos parceiros que o LEM, o Malacolab e a Empresa Júnior me deram, por tornarem meus dias mais alegres, pelos ensinamentos compartilhados, momentos vividos e principalmente pelo trabalho em equipe.

Gostaria de agradecer também a todos os funcionários, professores e terceirizados do Ifes - Campus Piúma, pelo acolhimento, ensinamentos, conversas e momentos felizes vividos aqui, em especial ao sr. Pedro (*in memorian*), por todas as histórias e momentos de lazer vividos.

A todos os meus colegas de curso, que estão comigo até hoje e os que seguiram novos caminhos, e aos colegas do totó, obrigada pelos momentos compartilhados.

Agradecimento especial as técnicas de laboratório, Amanda Soares, Daniella Sant'Ana e Suzana Menegardo, por sempre me ajudarem, com muita paciência, empenho e educação, sem vocês este trabalho não seria possível.

E um agradecimento especial a banca avaliadora por terem aceito o convite e por todas as contribuições feitas para este trabalho. O meu muito obrigada!

RESUMO

O pescado possui elevado valor nutricional e características físico-químicas e microbiológicas que o torna um alimento muito suscetível à deterioração, sendo necessárias alternativas que retardem e/ou inibam esta degradação, prolongando sua vida de prateleira e a segurança alimentar dos consumidores, o uso dos aditivos alimentares sintéticos tem sido cada vez mais restringido por conta de seus efeitos colaterais, com isso a busca por alternativas mais naturais para esse fim vem crescendo e sua aplicação tornou-se mais aceita pelos consumidores. Com isso, este estudo objetivou analisar a eficiência dos compostos naturais da *Psidium myrtoides*, no controle da microbiota contaminante do pescado. As plantas utilizadas para a obtenção dos extratos foram coletadas na natureza, higienizadas, desinfectadas, separadas e secas em estufa. Posto isso, foram trituradas, misturadas com álcool etílico P.A., nas proporções adequadas, por 72h. O extrato alcoólico foi filtrado, centrifugado e disposto para evaporação do solvente, de forma a obter apenas o extraído. Em sequência, foi submetido ao teste de inibição por difusão em disco contra cinco cepas bacterianas causadoras de DTA, sendo que os extratos com potencial antimicrobiano, avaliados nesta etapa, foram testados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), contra *Staphylococcus aureus*. O extrato que apresentou menor CIM e CBM, foi submetido à cromatografia líquida à vácuo, utilizando solventes de diferentes polaridades. Cada fração obtida foi submetida ao teste de inibição por difusão em disco. Por fim, a avaliação dos efeitos toxicológicos das frações foi desempenhada por meio do bioensaio com *Artemia salina.* Os resultados obtidos para o teste de inibição mostraram que todos os extratos apresentaram potencial antimicrobiano contra pelo menos três das cinco bactérias testadas, onde os halos médios de inibição variaram de 0,01 cm, para a *Salmonella typhi* e 0,93 cm, para o *Vibrio parahaemolyticus,* em seus valores mínimos e máximo. Já para os testes de CIM, o menor resultado foi de 4,8828 µg/mL e para a CBM o valor de 19,5313 µg/mL, do extrato bruto das folhas, mostrando-se com a melhor inibição dentre os extratos testados e a fração diclorometano obteve os valores de 250 µg/mL e 1000 µg/mL, para CIM e CBM, respectivamente. Para o teste de toxicidade foi determinada a CL 50% do extrato bruto das folhas na concentração de 287,53 mg/kg, sendo considerada tóxica. Com isso é possível concluir que a *Psidium myrtoides* apresenta boa atividade

antimicrobiana, o que a torna uma possível agente na conservação do pescado, porém devem ser realizados mais teste para efetivá-la como conservante natural.

Palavras-chave: bactérias causadoras de DTA, conservantes alimentares, qualidade do pescado.

ABSTRACT

Fish has a high nutritional value and physical-chemical and microbiological characteristics that make it a food very susceptible to deterioration, requiring alternatives that delay and/or inhibit this degradation, prolonging its shelf life and the food security of consumers, the use of synthetic food additives have been increasingly restricted due to their side effects, with this the search for more natural alternatives for this purpose has been growing and its application has become more accepted by consumers. With this, this study aimed to analyze the efficiency of the natural compounds of *Psidium myrtoides*, in the control of the contaminating microbiota of the fish. The plants used to obtain the extracts were collected in the wild, sanitized, disinfected, separated and kiln dried. That said, they were crushed, mixed with P.A. ethyl alcohol, in the appropriate proportions, for 72 hours. The alcoholic extract was filtered, centrifuged and disposed of for solvent evaporation, in order to obtain only the extracted. In sequence, it was subjected to the disk diffusion inhibition test against five bacterial strains that cause DTA, and the extracts with antimicrobial potential, evaluated in this step, were tested to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), against *Staphylococcus aureus*. The extract with the lowest MIC and MBC was subjected to vacuum liquid chromatography, using solvents of different polarities. Each fraction obtained was subjected to the disk diffusion inhibition test. Finally, the evaluation of the toxicological effects of the fractions was performed through the bioassay with *Artemia salina*. The results obtained for the inhibition test showed that all extracts showed antimicrobial potential against at least three of the five bacteria tested, where the mean inhibition halos varied from 0.01 cm, for *Salmonella typhi* and 0.93 cm, for the *Vibrio parahaemolyticus*, in their minimum and maximum values. For the MIC tests, the lowest result was 4.8828 µg/mL and for the MBC the value of 19.5313 µg/mL, of the crude leaf extract, showing the best inhibition among the tested extracts and the dichloromethane fraction obtained the values of 250 µg/mL and 1000 µg/mL, for MIC and MBC, respectively. For the toxicity test, the CL 50% of the crude extract of the leaves in the concentration of 287.53 mg/kg was determined, being considered toxic. With this it is possible to conclude that *Psidium myrtoides* has good antimicrobial activity, which makes it a possible agent in the conservation of fish, however more tests must be carried out to make it as a natural preservative.

Keywords: bacteria causing foodborn illnesses, food preservatives, fish quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Filtragem e evaporação dos extratos alcoólicos de diferentes órgãos da planta *P. myrtoides* após centrifugação. 27

Figura 2: Separação do extrato alcoólico de *Psidium myrtoides* por cromatografia líquida a vácuo, para obtenção das suas frações. 29

Figura 3: Teste da concentração inibitória mínima dos extratos alcoólicos de *Psidium myrtoides* e de sua fração, obtidas por cromatografia líquida à vácuo.....31

Figura 4: Atividade inibitória dos diferentes extratos alcoólicos de *Psidium myrtoides* contra bactérias contaminantes do pescado. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relações entre as massas e volumes utilizados nos testes de toxicidade dos extratos e fração da folha de *Psidium myrtoides* 32

Tabela 2: Rendimento dos extratos alcoólicos brutos dos diferentes segmentos de *Psidium myrtoides* 34

Tabela 3: Potencial inibitório dos extratos alcoólicos brutos de *Psidium myrtoides* ..38

Tabela 4: Concentração inibitória mínima dos extratos alcoólicos de *Psidium myrtoides* contra o patógeno *Staphylococcus aureus*. 43

Tabela 5: Taxa de mortalidade média expressa em números de *Artemia salina* mortas após exposição às amostras de extrato bruto e da fração diclorometano das folhas de *P. myrtoides* 48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Particularidades do peixe fresco. 19

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
µL	Microlitro
AN	Ágar nutriente
AN 3%	Ágar nutriente com 3% de Cloreto de sódio
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CL 50 %	Concentração Limite para a mortalidade de 50% dos indivíduos
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças transmitidas por alimento
g	Grama
h	Hora
Ifes	Instituto Federal do Espírito Santo
LABEV	Laboratório de botânica e ecologia vegetal
LEM	Laboratório de ecologia microbiana
µg	Micrograma
mg	Miligramas
MH	Müeller-Hinton
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
º C	Graus celsius
PA	Puro e Absoluto
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
ufc	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 OBJETIVOS 16

2.1 Objetivo Geral 16

2.2 Objetivos Específicos 16

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16

3.1 Pescado 16

3.2 Perecibilidade do pescado 18

3.3 Micro-organismos contaminante do pescado 20

3.4 Conservantes 22

3.5 Araçaúna 24

4 MATERIAIS E MÉTODOS 26

4.1 Amostragem e identificação do vegetal 26

4.2 Confecção do Extrato Alcoólico 26

4.3 Separação de frações do extrato por cromatografia líquida a vácuo (CLV). 28

4.4 Atividade antibacteriana dos extratos alcoólicos e de suas frações 29

4.4.1 Cepas e suspensões bacterianas 29

4.4.2 Atividade inibitória dos extratos vegetais 30

4.4.3 Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 30

4.4.4 Determinação da concentração bactericida mínima (MBC) dos extratos de planta 31

4.5 Bioensaio toxicológico agudo do extrato 32

4.6 Análise dos dados 33

5 RESULTADO E DISCUSSÃO 33

5.1 Amostragem e identificação do vegetal.....33

5.2 Rendimento do Extrato Alcoólico 34

5.3 Atividade antibacteriana dos extratos alcoólicos e de suas frações.....37

5.3.1 Atividade inibitória dos extratos vegetais.....37

5.3.2 Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcóolico de *P. myrtoides.*.....43

5.3.3 Determinação da concentração bactericida mínima (MBC) dos extratos de *Psidium myrtoides*.....45

5.4 Efeito toxicológico do extrato 47

6 CONCLUSÃO.....51

7 REFERÊNCIAS.....52

1 INTRODUÇÃO

Sabendo que os representantes do grupo pescado, são caracterizados por apresentarem altos índices nutricionais, este alimento tem sido mais consumido por ser uma boa fonte de aminoácidos essenciais e por ser saudável. Assim como outros alimentos, o manejo e a conservação deste produto marcam efetivamente a sua qualidade e segurança, devendo ser realizados com bastante cuidado (DANTAS FILHO, 2020).

Concomitantemente, é válido apontar que o pescado possui algumas especificações como uma taxa alta de atividade, não só de água nos tecidos como também metabólica dos micro-organismos, um alto valor nutricional, entre outras, que somadas conferem a esse grupo uma perecibilidade rápida após o abate (VEIGA FILHO & MESQUITA, 2018).

Para assegurar a qualidade do pescado, as técnicas de processamento, armazenamento e manuseio são pontos primordiais a serem levados em consideração. É notório apresentar que, para manter as propriedades, o tempo de retenção e a temperatura de estocagem destes alimentos são elementos chave na garantia de uma boa mercadoria, porque estão diretamente relacionados aos métodos deteriorantes e a disseminação de doenças (DUTTA et al., 2016; SOUZA et al., 2013).

Como uma alternativa de retardar o início da putrefação dos alimentos, são adicionadas algumas substâncias conservantes, provindas de diferentes fontes. Tendo em vista que os conservantes sintéticos são promissores de algumas adversidades como efeitos tóxicos, os aditivos naturais vêm ganhando mais espaço, por serem menos danosos a saúde e por se assemelharem em atuação, tornando-os cada vez mais factíveis de implementar (BARROS et al, 2020). Uma vez que a aquicultura vem contribuindo para o aumento do consumo de peixe e também no fornecimento de matéria prima para a indústrias de processamento, o que contribuiu para o pescado ser comercializado hoje em diferentes formas, indo desde os mais simples como o eviscerado, resfriado/congelado, posta e o filé, como também os produtos prontos para o consumo como embutidos, enlatados, bolinhos e hambúrgueres (ROSSETTO & SIGNOR, 2021), que fazem necessários a implementação de processos que garantam sua conservação e qualidade.

E para isso, tem-se hoje vários procedimentos que atuam no combate a deterioração dos produtos como forma de alongar os prazos de validades com segurança, dentre eles estão o tratamento térmico, remoção de umidade, uso de compostos para alterarem a acidez, processos de fermentação e o emprego dos conservantes (VENCATO et al., 2020).

O emprego de conservantes nos alimentos se dá em sua maioria com o uso dos compostos de origem sintética, porém esses representantes têm contribuídos para o surgimento de reações alérgicas e outros efeitos colaterais (THIPPESWAMY et al., 2015). E com isso a procura por alternativas mais naturais tem aumentado.

Dentre os compostos naturais, os componentes fenólicos ganham destaque para esta finalidade, pois atuam de forma a apreender e neutralizar os oxidantes e têm também ação inibitória do caráter catalisador da produção de radicais livres, quando associados aos íons metálicos, (VERRUCK et al., 2018). São antioxidantes que desempenham uma função essencial na redução da oxidação lipídica em tecidos, tanto vegetal quanto animal. Quando incluídos na alimentação, ajudam não só na manutenção da qualidade do insumo, como também na diminuição dos índices de disseminação de patologias, como arteriosclerose e o câncer por exemplo (ANGELO & JORGE, 2007). Em adição, ainda mostram ação antimicrobiana e propriedades antimutagênicas (BARBOSA, 2010).

Posto isso, como uma fonte potencial desses recursos está a *P. myrtoides*, que detém um alto valor nutricional e um alto teor de compostos bioativos, com nove vezes mais flavonoides que a goiaba (*P. guajava*), tendo em sua constituição ainda, concentrações de ácido gálico, epicatequina, epigalocatequina, kaempferol, catequina, quercetina, rutina e cafeína (FERREIRA, 2020), além de ser rica em vitamina C, sais minerais e baixo em açúcar (SOUSA, 2019).

Esse vegetal encontra-se na família Myrtaceae, que abrange 144 gêneros e 5.500 espécies de plantas com grandes divergências e complexidades em suas espécies e que, por esta razão, promovem um significante papel na ecologia, explicado por servirem como fonte de alimento para outros organismos e apresentarem potencial terapêutico e aplicação medicinal (SOUSA, 2019).

Esta família, é caracterizada por um imenso sortimento de morfologia de frutos e estratégias fenológicas, sendo essas estratégias importantes na conservação

da função geral do ecossistema. Além disso, apresentam organismos poliploides, o que pode ser uma das explicações para seu amplo domínio nos diferentes grupamentos vegetais (TULER et al., 2019).

Sousa (2019), afirma que esses vegetais, além de serem utilizados na alimentação, também estão presentes no ramo medicinal, apesar de terem seus recursos genéticos ainda pouco estudados, mas é sabido sobre seu grande potencial e ampla resistência às diferentes condições bióticas e abióticas.

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Psidium* spp., que compõe essa família, 60% delas são recorrentes dentro dos biomas brasileiros. Tal amplitude de ocupação pode ser dada pela capacidade competitiva superior destes organismos, fator que lhe confere destaque (TULER et al., 2019).

O Espírito Santo engloba 14 espécies pertencentes a esse gênero, dentre elas *Psidium brownianum*, *P. cattleianum*, *P. cauliflorum*, *P. guajava*, *P. guineense*, *P. longipetiolatum*, *P. myrtoides*, *P. oblongatum*, *P. oligospermum*, *P. ovale*, *P. rhombeum*, *P. rufum*, *P. sartorianum* (TULER et al., 2017).

A *Psidium myrtoides*, popularmente conhecida como araçá-roxo ou araçaúna, é amplamente distribuída no Brasil, presente nos biomas Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. As características do seu fruto englobam a porção da casca, marcada por uma coloração compreendida entre os nuances de roxo, assim como sua polpa, quando maduras; já suas sementes são envoltas por uma discreta película e sua polpa é densa (SILVA et al., 2019; TULER et al., 2019).

Somado a isso, a espécie apresenta folhas com três tipo de formatos, obovada e ovadas, que se diferem apenas na porção de afilamento da folha, onde na primeira a parte mais fina encontra-se no ápice; já na segunda, este estreitamento é observado na base da folha, e também a forma de elipse, onde há um achatamento nas extremidades e alongamento da parcela central, suas dimensões variam de 5 x 2 cm até 13 x 4,5 cm, constituídas também por uma nervura central e laterais, sendo estas pareadas, e visíveis em qualquer lado da folha (TULER et al., 2017: RIZZINI, 1977) .

E segundo o estudo de Viana (2019), a araçaúna desempenhou uma boa atividade antimicrobiana, principalmente em relação ao *Staphylococcus aureus*, uma

bactéria deteriorante do pescado, o que mostra sua potencialidade de aplicação para esta finalidade.

Com isso, a araçaúna é um vegetal com grande potencial de aplicação na conservação do pescado e na indústria de processamento, frente a gama de constituintes e suas atuações já listadas anteriormente, sem contar que é um representante nativo e com grande abundância em quase todo o território brasileiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como principal objetivo analisar a eficácia de compostos naturais extraídos da *Psidium myrtoides*, no controle da microbiota contaminante do pescado.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a espécie vegetal araçaúna nativa do Espírito Santo;
- Realizar a extração alcóolica das diferentes partes vegetais;
- Analisar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos;
- Fracionar os extratos alcoólicos utilizando cromatografia líquida a vácuo;
- Avaliar a atividade das frações obtidas no controle dos micro-organismos contaminantes;
- Analisar a toxicidade dos componentes dos extratos com atividade antimicrobiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pescado

De acordo com o disposto no artigo 205, do Decreto nº 9.013, da Presidência da República, o grupo pescado é composto pelos peixes, crustáceos, anfíbios, moluscos, répteis, equinodermos e demais animais aquáticos que possuam potencial inclusivo na dieta humana (BRASIL, 2017).

É importante salientar que os alimentos de procedência do ambiente aquático mais precisamente marinho, são considerados uma excelente fonte de

proteínas para o consumo humano, e também de lipídeos, em que alguns compostos pertencentes a este grupo, são fundamentais na ação preventiva de patologias cardiovasculares, assim como atuação vascular e hemostática e também na intervenção da produção de prostaglandinas (FURLONG et al., 2006).

O pescado é um alimento vasto em aporte nutricional, na presença de micronutriente, alguns minerais, contam ainda com o fornecimento de ácidos graxos essenciais e sua digestibilidade é rápida, e com amplo segmento vitamínico (SANTOS et al., 2018).

Torna-se imprescindível dizer que o pescado detém de um grande valor nutricional sendo rico em proteínas e minerais. Este alimento possui uma grande proporção de água, variando de 70% a 85% do corpo; já as proteínas podem chegar de 20% a 25% do total corporal, sendo estas, fontes de todos os aminoácidos essenciais dentre eles a lisina, metionina e cisteína. Seu aporte lipídico é relativo, podendo chegar a 10%, como exemplo dos ômega-6 e ômega-3. Quanto ao teor de minerais, faz-se presente o cálcio, fósforo, ferro, cobre e selênio, podendo alcançar à marca de até 1,5% do total corporal. Assim, tal iguaria torna-se altamente benéfica e completa para o consumo, como para a saúde (SILVA et al., 2017).

Outro fato a ser apontado é que o pescado é constituído por muitas vitaminas, tanto hidrossolúveis quanto lipossolúveis, dentre elas podemos elencar as do complexo B, A e D por exemplo. Em relação aos minerais, fazem-se presentes sódio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo, cloro, enxofre, ferro, iodo, cobre, zinco, selênio, cromo, níquel, e outros mais, tornando este tipo de alimento altamente benéfico ao consumo humano (ARAÚJO et al., 2010).

Segundo Maciel e colaboradores (2015), o pescado tem dentre suas partes comestíveis, os valores de 55% a 60% do total do corpo, com um contributo de aminoácidos íntegro, sendo que quando consumidos uma porção de 200g de pescado, esta supre totalmente a carência de pelo menos cinco aminoácidos essenciais recomendados para uma alimentação saudável. O autor afirma ainda que a digestibilidade varia de 90% a 95%. A digestibilidade do pescado é marcada por alguns fatores como a concentração das proteínas ligadas ao tecido conectivo serem menores do que as proteínas ligadas as estruturas musculares, como também pelas dimensões de comprimento serem inferiores facilitando a ação enzimática e por fim

as proteínas serem mais instáveis na presença de calor do que a dos mamíferos por exemplo (MARQUES, 2018).

Para garantir um bom produto, fatores como ação enzimáticas, presenças de toxinas, produção de aminas biogênicas, ação microbiológica, contaminação por metais pesados, e também por ações químicas, oxidativa e autolíticas, devem ser bem controlados ou combatidos por serem os principais agentes que afetam e modificação o frescor e sanidade do alimento (MACHADO et al., 2010).

Em adição a isso, as propriedades do pescado ainda sofrem alterações por outras questões como as estações do ano, o nível de maturação gonodal, a idade, a porção corpórea, os segmentos organolépticos e também nutricionais, fazendo com que estes fatores sejam levados em consideração para o uso sustentável dos recursos pesqueiros como também para sua maior rentabilidade na industrialização (BARROS et al., 2019).

3.2 Perecibilidade do pescado

Um dos principais pontos que influenciam no consumo do pescado é o processamento, pois é a partir dele que o pescado ganha maior valor agregado e pode ser vendido tanto na forma in natura, englobando o pescado fresco e adquiridos crus, quanto industrializada, ou seja, esta passa por um procedimento mais robusto de manuseio e conservação (BOMBARDELLI & SANCHES, 2008).

Conforme exposto por Penha e colaboradores (2020), a decomposição iniciada após a morte do organismo é marcada por fatores que aceleram suas reações, como é o caso dos fatores endógenos e exógenos, envolvendo assim, processos físicos, mecânicos, químicos e biológicos.

Por esse motivo, deve-se ter um conhecimento acerca das fases que acometem o pescado, após o abate, sendo elas a hiperemia, muito evidente em peixes, que é a liberação de muco hidrofóbico produzidos pelas células mucosas, sendo que sua composição molecular contribui para a proliferação de micro-organismos, outro ponto é o rigor mortis, que leva a diminuição do pH do pescado, por conta da produção de ácido lático, conferindo a carne uma rápida conservação, todavia é importante saber que esta etapa é muito influenciada pela forma de abate que o pescado sofreu, por conta do seu gasto energético, sendo este o principal fator que interfere na duração do rigor mortis. Em sequência, o pescado é submetido as

ações químicas e autolíticas, marcadas pela ação das enzimas degradantes, como as proteolíticas, o que gera uma maior flacidez do musculo como também o aumento das concentrações de compostos voláteis e por fim, a degradação pelos microrganismos decompositores, sendo todos esses fatores responsáveis pela degradação gradativa da carne (VEIGA FILHO & MESQUITA, 2018).

É importante acrescentar que no pleno *rigor mortis*, a musculatura se enrijece, desencadeando várias modificações bioquímicas celulares e por esse motivo é possível determinar o tempo que este organismo levou até a sua morte, e isso é de grande valia para as indústrias que usam da carne como matéria prima, para garantia de um produto fresco, ou seja o pescado que recebe apenas o tratamento conservativo de controle de temperatura corporal, mantendo-a próximas a do gelo e menos avançado nas fases de degradação (GALIMOV et al., 2018; BRASIL, 2020).

O pescado é muito suscetível ao processo de deterioração, em razão da sua constituição química específica, seu potencial hidrogeniônico próximo as escalas neutras, do aporte fosfolipídicos e da intensa atividade hídrica e deteriorante de enzimas teciduais, que contribuem para o aumento do desenvolvimento da microbiota e consequentemente a degradação da carne (SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2017).

É importante acrescentar que a entrada dos micro-organismos, se dá de forma mais acentuada nas porções branquiais, do tegumento, epitélio e também na cavidade abdominal, fazendo com que a manipulação seja ainda mais cautelosa nessas áreas (PENHA et al., 2020).

É irrefutável que os mecanismos de retirada de calor são essenciais para a desaceleração não só do aumento do pH bem como da ação microbiológica na carne, promovendo assim, uma conservação significativa e consequentemente a manutenção de seu frescor, atendendo tanto os padrões de segurança quanto aceitabilidade do mercado (FERREIRA et al., 2020).

Sendo assim e tendo ciência do explícito no artigo 210, do Decreto nº 9.013, da Presidência da República, as características sensórias que definem um peixe fresco estão dispostas abaixo e devem ser:

Quadro 1: Particularidades do peixe fresco.

Porção corporal	Característica
Abdome	Normal e firme.
Ânus	Fechado
Brânquias/Guelras	Coloração avermelhada, úmidas e brilhantes.
Carne	Firme, consistência elástica, coloração e aroma natural.
Escamas	Brilhantes e aderidas à epiderme.
Nadadeiras	Resistentes à ação mecânica induzida.
Olhos	Brilhosos, transparentes, vivos, convexos e preenchendo toda a cavidade ocular.
Tegumento	Limpo, brilho metalizado, reflexos multicores particulares de cada espécie.
Vísceras	Diferenciadas, em perfeito estado e o peritônio aglutinado a cavidade celomática

Fonte: BRASIL (2017).

Posto isso, torna-se indispensável abordar que as circunstâncias de manipulação juntamente com a estocagem, regulam as etapas de liberação de muco, *rigor mortis*, autólise e ação bacteriana, em contrapartida a velocidade delas são particulares para cada espécie, sendo assim, imprescindível manter o máximo de atenção e cuidados a fim de assegurar a qualidade do alimento (ARAÚJO et al., 2010).

3.3 Micro-organismos contaminantes do pescado

Visto que o pescado como qualquer outro alimento é susceptível a ação de patógenos e contaminantes, é possível dizer que são passíveis de se tornarem vetores para disseminação de doenças, com isso é indispensável a manutenção de sua qualidade, bem como o desenvolvimento de técnicas que combatam processos que firam sua integridade (DESLANDES, 2017).

Sabendo que os micro-organismos relacionados aos alimentos, são divididos em deteriorantes, patogênicos ou potencialmente patogênicos, produtores de metabólitos tóxicos e atuantes na tecnologia e/ou nutrição do alimento, é possível afirmar que sua classificação se dá por meio da forma de atuação (ANVISA, 2018).

Os contaminantes dos organismos aquáticos variam tanto conforme a temperatura do meio em que estão inseridos, quanto com a salinidade. O grupo dos psicrófilos, como *Pseudomonas, Alteromonas* spp., *Moraxella* spp., *Acinetabacter*

spp. e *Vibrio* spp., fazem-se comuns em águas mais frias, enquanto os mesófilos, como *Micrococcus* spp. e *Bacillus* spp., são abundantes em águas mais quentes. Em ambientes onde há uma elevada salinidade, encontram-se os *Sarcina* spp., *Vibrio* spp., *Flavobacterium* spp., *Serratia* spp., *Bacillus* spp.; já em salinidades baixas ou nulas, estão presentes os *Lactobacillus* spp., *Streptoccocus* spp., *Brevibacterium* spp. e *Aeromonas* spp., por exemplo (DESLANDES, 2017; ARAÚJO et al., 2010).

É indispensável abordar que a análise microbiana é um dos parâmetros mais importantes e de maior preocupação pelas empresas de processamento de pescado, frente ao seu caráter comprometedor da seguridade do produto. Sabendo disto, destacam-se *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*, Norwalk-like vírus, Rotavírus, *Cryptosporidium parvume* e *Giardia lamblia*, como os substanciais representantes patogênicos relacionados à contaminação do pescado (SILVA et al., 2017).

Segundo o disposto na Instrução Normativa nº 60, do Ministério da Saúde, para o pescado cru, não é permitida a presença de nenhuma ufc/25g para o gênero *Salmonella*, para o *Staphylococcus* coagulase positiva, os níveis aceitos variam de 10^2 a 10^3 ufc/g; já, para a *E. coli* é de 50 a 5 x10^2 ufc/g quando o alimento não é consumido cru e as marcas de 10 a 10^2 ufc/g, quando o pescado for para consumo sem nenhum cozimento (BRASIL, 2019). Sabendo disso, fica claro a importância de realizar sempre a análise microbiológica nos alimentos, como forma de controle, segurança e adequação as legislações vigentes.

Segundo exposto por Ferraz e colaboradores (2015), um dos principais agentes comprometedores da saúde pública são as doenças transmitidas por alimentos (DTA), por essa razão, é importante o desenvolvimento de mecanismos e técnicas para retardá-las. Os principais causadores destas patologias são micro-organismos provenientes do recurso hídrico e/ou insumos contaminados, sendo que os organismos *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* ganham destaque e são responsáveis por 90,5% das ocorrências destas enfermidades (DAMACENA, 2019).

Porém é importante dizer que os agentes etiológicos das DTA são agrupados em classes, sendo elas, infecciosa, intoxicante e toxigênicas. Os gêneros

Salmonella, *Campylobacter* e a *E. coli*, são representantes da primeira repartição; já *Bacillus cereus*, *S. aureus* e *Clostridium botulinum* fazem-se presentes no segundo grupo e por fim, na última classificação encontram-se também *E. coli* e *B. cerus* enterotoxigênica, além da *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *Clostridium perfringens* (MELO et al., 2018).

Segundo Cribb e colaboradores (2018), a *S. aureus*, bactéria de procedência humana, quando presentes nos alimentos, são indicativos da carência higiênica e manejo inadequado, sendo característica por causar desarranjo gastrointestinal em quem a consome, e sua contaminação é facilitada através de produtos cárneos e verduras. Em adição, a *Salmonella* spp., uma enterobactéria de natureza animal, é responsável por desencadear infecção intestinal, muito ocorrente por contaminação cruzada nos produtos, principalmente nos de origem cárnea e ovos, acusando uma manipulação errônea. Já a *E. coli*, natural do trato intestinal de animais homeotérmicos, também é indicativo de contaminação cruzada, limpeza ineficiente do meio e dos produtos. Causadoras não só de desequilíbrio gastrointestinal como também de febre e calafrios, sendo comuns em muitos alimentos. Por fim, a *V. parahaemolyticus*, natural dos corpos hídricos com altas salinidades, é característica por desencadear desarranjo intestinal, febre e até mesmo desidratação de quem a ingere, com isso acomete em mais abundâncias, alimentos de procedência marinha, fazendo-se necessário as práticas de cozimento e limpeza adequadas dos pescados.

Após a ciência disso, faz-se necessário o aprimoramento de medidas empregadas no pescado a fim de reduzir a atividade microbiológica e assim retardar a decomposição destes recursos (SILVA et al., 2017).

3.4 Conservantes

De acordo com o Ministério da Saúde, em sua Portaria nº 540, fica definido que aditivos alimentares são quaisquer substâncias introduzidas no produto, de maneira programada, sem caráter nutritivo, sendo apenas com a intenção de alterar as características físico-químicas, biológicas e/ou sensoriais, durante qualquer etapa de produção do alimento. Além disso, esses compostos ou suas derivações podem tornar-se constituintes do alimento empregado, excluindo assim os contaminantes e matérias nutritivas utilizadas para aumentar ou impedir a perda do valor nutricional.

Consonante a ANVISA (2015), os aditivos alimentares possuem uma classificação conforme sua serventia, sendo então divididas em substâncias acidulantes, capazes de elevar a acidez e aferir sabor ácido no alimento, compostos antioxidantes, responsáveis por delongar as modificações oxidativas dos produtos, antiumectantes, que contribuem para a redução do caráter higroscópico, ou seja da capacidade de absorção de água (PEDROZO, 2018), as conservadoras, que atuam no impedimento e/ou espaçamento das modificações enzimáticas ou de micro-organismos, e por fim, as substâncias reguladoras de acidez, que descaracterizam ou moderam a acidez e a alcalinidade nos suprimentos.

Tendo em vista que elementos como conservantes, especiarias e algumas ervas, quando inseridas nos alimentos, são capazes de afetar o desenvolvimento de um vasto leque de micro-organismos, é possível dizer então que elas são contribuintes da qualidade e conservação, fazendo com que o produto possua uma validade expandida (ANVISA, 2018).

Este cenário é abarcado pelos compostos de origem sintética, que são inseridos nos alimentos, todavia acarretaram inúmeros efeitos colaterais e por esta razão, faz-se necessário a busca de alternativas menos danosas (THIPPESWAMY et al., 2015). Assim como ocorre com os antibióticos, os antioxidantes sintéticos vêm sendo limitados e seu uso restringido a determinadas concentrações, por contribuírem para ocorrência de mutações na microbiota, tornando-a mais resistente aos métodos de controle e eliminação (MACIEL et al., 2012).

Por este motivo, a inserção de alguns conservantes é restringida no ramo alimentício e farmacêutico, frente aos níveis de toxicidade e alergênicos. Logo, aumentou-se a busca por compostos naturais como forma de comutar os já utilizados (LIMA et al., 2019).

Porém o uso dos conservantes naturais como o sal e o açúcar, também têm sido controlados por estarem diretamente relacionados a causas e/ou agravamento de doenças como hipertensão e diabetes (VENCATO et al., 2020), fazendo com que a busca por elementos naturais que não apresentem este tipo de efeito seja maior e preferível.

É comprovado que os vegetais são ricos em substâncias que contribuem para conservação alimentar, atrelado a isso, agem de forma positiva para o

enriquecimento nutricional do alimento base sendo assim uma forma de segurança como também de suprimento. Dentre eles estão os flavonoides, que possuem efeito antioxidante, sendo de grande valia sua inserção nos produtos a fim de assegurar sua qualidade, além de atuarem na prevenção de patologias cardiovasculares e oncológicas. Estima-se que tais benefícios estejam atados ao mecanismo de combate aos radicais livres e captação de metais catalisadores da peroxidação de lipídeos (GALO et al., 2018).

Desta forma, os compostos naturais de procedência vegetal, além de possuírem uma boa atuação como conservantes, devido ao fato de deterem propriedades bacteriostáticas e bactericidas, contribuem também para o torná-lo mais aceitável, quando é empregado nos alimentos, por parte da população que o consome (MACIEL et al., 2012).

E para fazer o uso correto de um composto natural com a função de um antimicrobiano, deve-se levar em consideração alguns pontos, como por exemplo, ter o conhecimento e o estudo da formulação química e também sensorial, para que não haja modificação nas características principais do alimento o qual será inserido, é essencial saber a efetividade da sua capacidade inibitória contra os micro-organismos, para assim ser feito seu uso de forma adequada e por fim garantir a segurança tanto do composto quanto do uso, como forma de apenas somar benefícios ao alimento e não trazerem riscos à saúde do consumidor (BARROS et al., 2020).

3.5 Araçaúna

A *Psidium myrtoides* é caracterizada por ser uma árvore de grande porte, seu caule é do tipo tronco com presença de cascas esfoliantes e lâminas papiráceas (descamações finas). Sua folhagem é proveniente do mesmo nó do caule de forma a se oporem e atingindo o comprimento de 2,5 a 7,5 centímetros. Na floração apresenta botões abertos com à presença de 4 lobos e as frutificações são caracterizadas por serem verdes na fase inicial e quando maduras são roxas (REIS, 2019).

De acordo com Tuler e colaboradores (2017) os representantes da *P. myrtoides* são constituídos de folhas elípticas e frutas do tipo piriformes com sépalas arredondadas e persistentes, sendo que seu porte varia de 3 m a 20 m de altura e por fim seu período de florescer concentra-se entre abril e dezembro, já o frutífero ocorrente entre fevereiro e dezembro, ou seja bem prolongados durante o ano.

São pertencentes ao grupo das angiospermas e seu gênero está presente nos biomas brasileiros, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, sendo algumas espécies endêmicas e outras mais abrangentes dentro deles. Essa ocorrência pode ser ocasionada devido a alguns destes vegetais serem poliploides, como é o caso da *P. myrtoides*, e assim possuírem uma capacidade competitiva superior. Esse gênero, assim como outros representantes da família Myrtaceae, apresentam uma grande amplitude de estratégias fenológicas que asseguram o seu papel nos ecossistemas (TULER et al., 2019).

É importante dizer que os grupamentos botânicos produzem inúmeros compostos e dentre eles sobressaem-se os terpenos, os compostos nitrogenados e os fenólicos. O primeiro engloba parte dos metabólitos primários e abrange cerca de 25.000 substâncias, o segundo conta com a composição de alcaloides, glucosinolatos e cianidrinas, e o último é composto por flavonoides, xantonas, cumarinas, ligninas e conta com uma gama de 8.000 representantes, sendo importante dizer que possuem um elevado potencial antioxidante que não deve ser desconsiderado (REIS, 2019).

Sabendo disto, é possível afirmar que os extratos da araçaúna são compostos por estes mesmos constituintes, fazendo com que eles possam ser uma alternativa de aplicação como conservante alimentar, em razão de possuírem função antioxidantes, sendo então cabíveis de aplicação na conservação do pescado visto que na fase de *rigor mortis* desses organismos são desencadeadas várias reações oxidativas, que levam junto a outros fatores a rápida degradação da carne (CHRIST-RIBEIRO et al., 2016; VEIGA FILHO & MESQUITA, 2018).

O gênero *Psidium* é formado por aproximadamente 100 espécies originárias no Brasil e dispersas na faixa neotropical. Sendo todas com valor econômico potencial, devido ao fato de serem grandes fontes de matéria prima para a biotecnologia frente ao seu aporte genético, assim como na produção de compostos bioativos (VASCONCELOS et al., 2019).

Este grupo é utilizado também para produção de madeiras, papel, postes e até mesmo carvão vegetal, sendo empregadas no conhecimento empírico para o tratamento de patologias gastrointestinais, hemorragias e infecção frente ao seu potencial adstringente, alavancando assim sua importância econômica (BERNARDES et al., 2018).

Macedo (2019) afirma que a folhagem da araçaúna é muito empregada para o tratamento não só de diarreia e disenterias geralmente causadas por *Candida* spp, como também inflamações generalizadas. Outra aplicação importante descrita é o efeito benéfico dos óleos essenciais com potencial antibacterianos e antiproliferativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem e identificação do vegetal

Os espécimes utilizados neste experimento foram obtidos no município de Anchieta, com localização sul litorânea do estado do Espírito Santo, Brasil. Após a coleta, uma parcela das porções vegetais foi levada para o laboratório LABEV – Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal do Ifes – Campus Piúma, onde ocorreu a confecção da exsicata para depósito e identificação no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo em Jerônimo Monteiro.

4.2 Confecção do Extrato Alcoólico

Os demais vegetais coletados foram encaminhados ao LEM - Laboratório de Ecologia Microbiana do Ifes, campus Piúma, onde houve a separação das partes: caule, flores, folhas, frutos (maduros e verdes) e sementes (provindas de frutos maduros e verdes), foram higienizados em água clorada corrente para remoção das impurezas superficiais. Posto isso, houve a disposição em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 10 min, a fim de eliminar boa parte da carga microbiana atuante, sendo selecionadas apenas as partes íntegras dos exemplares. Em sequência, cada segmento foi lavado com água destilada, e levados à Estufa bacteriológica (Lucadema/Modelo LUCA81/100) para secagem sob temperatura de 45 °C. Após este processo, as partes de folhas, flores e frutos, foram maceradas com cadinho e pistilo; já, as sementes e o caule contaram com o uso de liquidificador industrial (Spolu), atentando-se sempre a higienização e desinfecção com álcool etílico 70% de um segmento para outro. Após a obtenção do um pó fino, foi realizada a pesagem, em Balança analítica (Marte/Modelo ay220), do montante obtido de cada porção. Em seguida, realizou-se os cálculos de proporção dos pesos e volumes de forma personalizada, tendo como base que para cada 50 g de pó corresponderia a 200 mL de álcool etílico P.A., com isso, foi possível inserir a quantidade necessária do solvente de acordo com a massa, havendo então a mistura dos dois compostos em um recipiente de vidro com tampa e envoltos com papel alumínio, de modo a impedir a

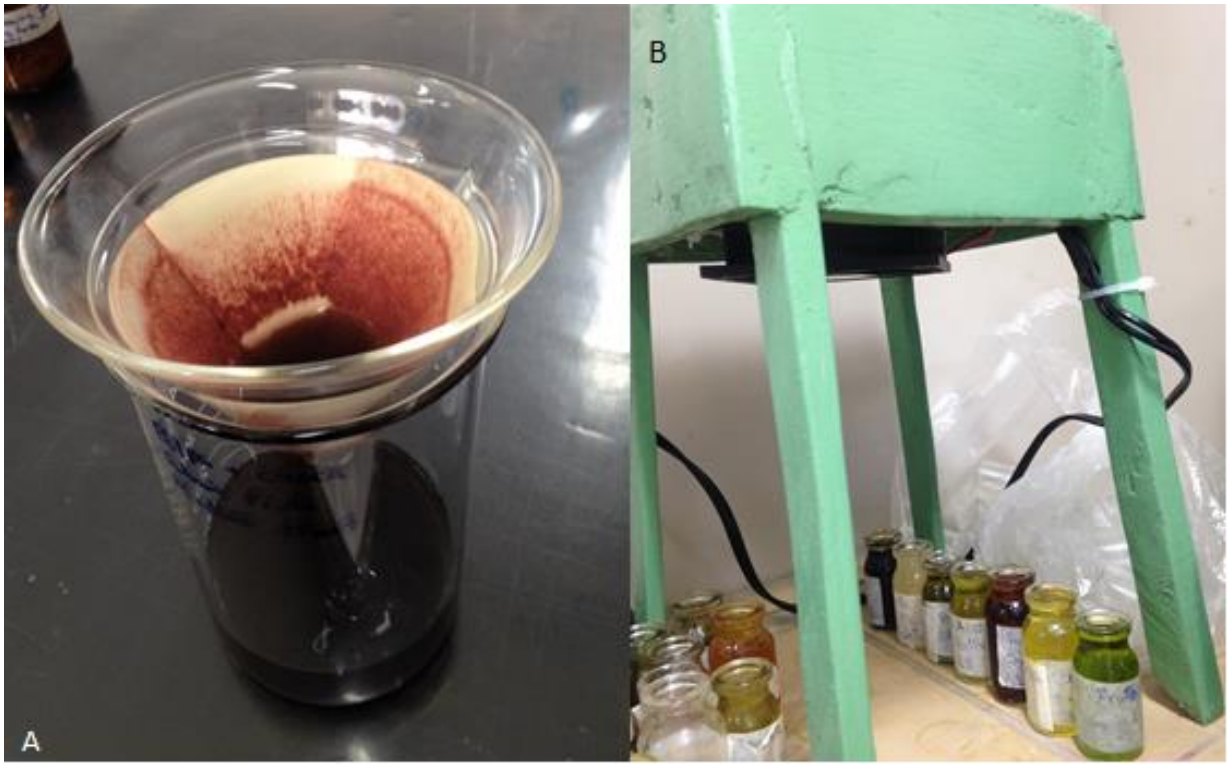
passagem de qualquer feixe de luz. Os recipientes devidamente identificados foram dispostos na Capela de exaustão de gases (Sppencer/Modelo spv150mdf), por dois dias, realizando agitação manual vagarosa e pausada durante este período. Findado este processo, os extratos foram filtrados em papel filtro (Figura 1), e centrifugados em Centrifuga (Daiki/ Modelo DT4500) a 4000 rpm por 20 minutos, sendo assim dispostos em capela, sob ventilação (Figura 1), para total evaporação do solvente. Por conseguinte, o material obtido foi pesado e armazenado em geladeira, possibilitando então, realizar o cálculo do rendimento de acordo com a Equação 1.

Equação 1 – Cálculo do rendimento do extrato alcoólico.

$$E = (R \div S) \times 100$$

Onde E é o rendimento do extrato expresso em porcentagem, R é o peso do extrato alcoólico, S é o peso da amostra bruta do vegetal e 100 é para obtenção do valor em porcentagem.

Figura 1: Filtragem e evaporação dos extratos alcoólicos de diferentes órgãos da planta *P. myrtoides* após centrifugação.

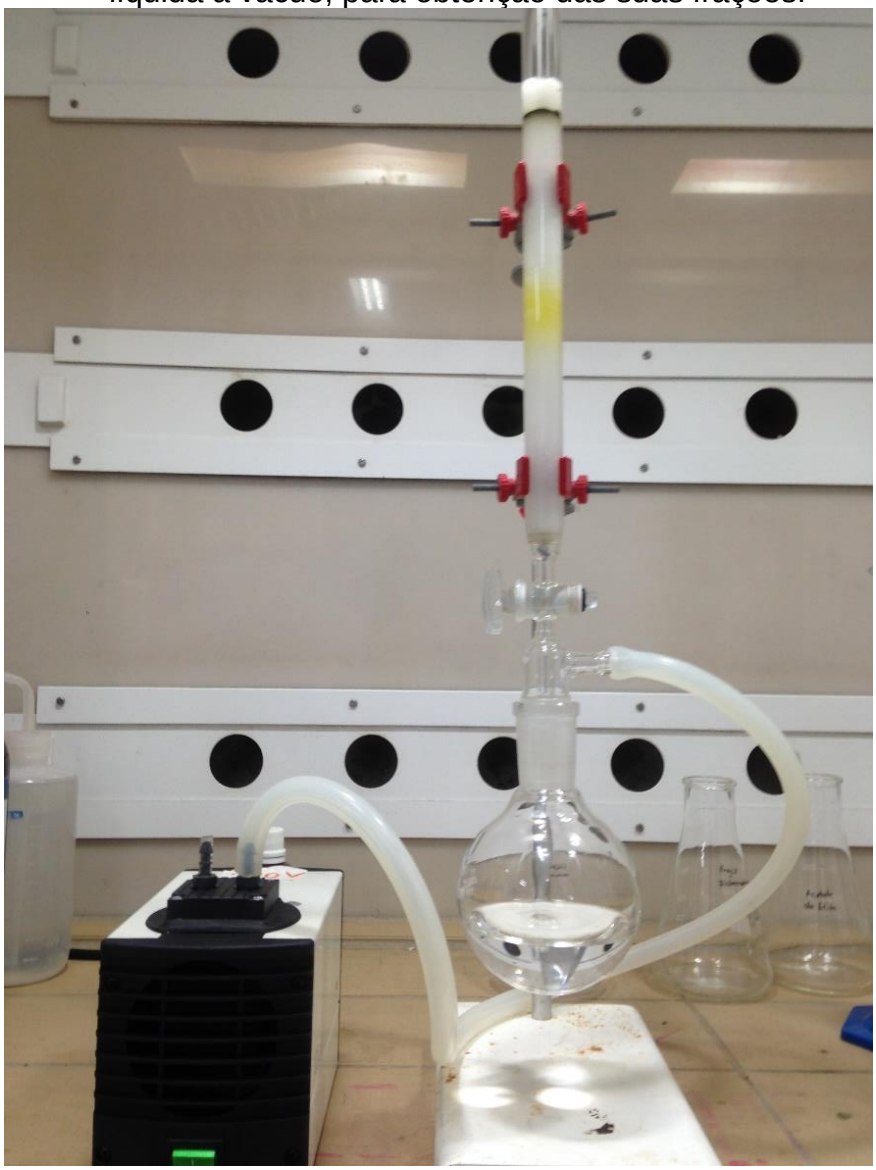


A) Processo de filtragem do extrato alcoólico; B) Evaporação do solvente.
Fonte: Autora.

4.3 Separação de frações do extrato por cromatografia líquida a vácuo (CLV).

O extrato alcoólico obtido foi submetido ao processo de cromatografia líquida a vácuo (Figura 2), realizado na Capela de exaustão de gases, em que contou com uma coluna de vidro, onde foram inseridos um quantitativo de sílica gel 60 230-400 mesh ASTM (Macherey-Nagel) de aproximadamente 21 cm de altura, como fase estacionária e, para a fase móvel, foram utilizados solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, Metanol e Água destilada), com um volume de 250 mL cada. A amostra foi pesada em 0,01 g e misturada com uma pequena parcela de sílica gel utilizada na coluna, até a homogeneidade. Após isso, a mistura foi inserida na coluna de vidro e iniciou-se o procedimento de separação por polaridade. E em seguida, foram submetidos a evaporação total na Capela até a obtenção apenas do extrato sólido, que foi testado quanto a inibição de patógenos por difusão em disco.

Figura 2: Separação do extrato alcoólico de *Psidium myrtoides* por cromatografia líquida a vácuo, para obtenção das suas frações.



Fonte: Autora.

4.4 Atividade antibacteriana dos extratos alcoólicos e de suas frações

4.4.1 Cepas e suspensões bacterianas

A ação antibacteriana de cada extrato e frações vegetais foi inicialmente analisada utilizando cinco cepas bacterianas causadoras de DTA. Em que duas foram Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e três Gram negativas, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Vibrio parahaemolyticus*. Todas as cepas foram mantidas crio preservadas no LEM, em solução de glicerol 20%, sob temperaturas de - 80 ºC em Utrafreezer (COLDLAB/ Modelo CL580-86V). Para o teste de inibição *in vitro*, inicialmente realizou-se a cultura das cinco cepas dispostas em placas de Petri

com meio de cultura AN e AN 3% para o *V. parahaemolyticus*, em estufa bacteriológica à 35 °C por 24 h. O preparo da suspensão bacteriana deu-se pela utilização de solução salina estéril 0,85% de NaCl, onde foram suspendidas as colônias recém cultivadas, então, cada suspensão foi homogeneizada no Agitador de tubos tipo vórtex (Phoenix/Modelo AP 56) e ajustada no Espectrofotômetro UV/VIS (Marte/Modelo 560) à densidade de 10^8 ufc/mL, de cada bactéria.

4.4.2 Atividade inibitória dos extratos vegetais

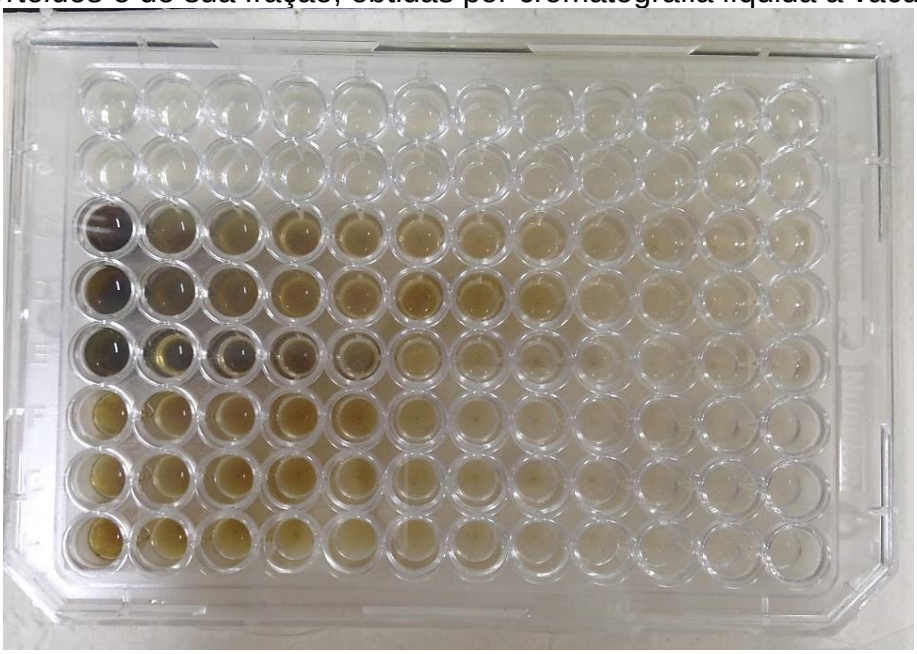
Esta ação foi avaliada pela metodologia de difusão em disco, em que os extratos foram novamente dissolvidos em seus respectivos solventes, de forma a manter a concentração de 500 µg/µL e em seguida inseridos em disco de papel filtro, com diâmetro de 0,7 cm, previamente esterilizado em Autoclave automática (Digitale/Modelo Av 75) por 15 min a 121°C, bem como todas as pinças, ponteiras e placas de Petri utilizadas para disposição e manuseio dos discos e das soluções. Foi adicionado um volume de 20 µL tanto dos extratos suspendidos como dos solventes controle, em cada disco, em triplicata. Após este procedimento, as placas permaneceram em Câmara de fluxo laminar (BSTEC/Modelo V1) fechada até total evaporação dos solventes. Cada suspensão bacteriana foi disposta, por meio de *swab* estéril, sobre toda a superfície do meio de cultura Müller-Hinton (MH), presente nas placas de Petri, em sequência, foi adicionado de forma cuidadosa cada disco contendo o extrato sobre a mesma superfície, respeitando a procedência de cada extrato, sem haver mistura. As placas foram encubadas na estufa bacteriológica à 35 °C por 24 h, para assim, realizar a medição dos halos de inibição formados.

4.4.3 Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os extratos alcoólicos de plantas, que apresentaram potencial inibitório no teste de difusão em disco, foram submetidos ao teste de CIM, que conta com o uso de diluições do extrato a ser analisado em meio de cultura e também suspensão bacteriana, sendo disposto em placas de microtitulação de 96 poços (Figura 3). Inicialmente o extrato foi pesado e diluído com dimetilsulfóxido (DMSO) e caldo MH, de forma a obter a concentração inicial de 5000 µg no primeiro poço, sendo assim reduzida pela metade até o final dos 12 poços. Foi feita uma fileira para o grupo controle, contando com a inserção de 200 µL do extrato diluído conforme citado. Para o teste, foi separada mais três fileiras, em que foram inseridos 100 µL de cada concentração do extrato diluído e em seguida adicionado 100 µL da suspensão

bacteriana em cada poço. Por fim, foi feita uma fileira de 12 poços para o controle negativo usando apenas o caldo MH e uma para o controle positivo, usando apenas a suspensão da bactéria, ambos usando o volume de 200 µL por poço. As microplacas foram incubadas em estufa por 24 h a 35 °C. Todo o teste foi desempenhado utilizando a cepa de *S. aureus* como patógeno de interesse e as concentrações mais baixas, sem crescimento visível obtiveram a confirmação da CIM. Já, para a fração obtida por CLV, foi realizada a mesma metodologia descrita, porém testou-se as seguintes concentrações (µg): 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 250,125 e 62,5.

Figura 3: Teste da concentração inibitória mínima dos extratos alcoólicos de *Psidium myrtoides* e de sua fração, obtidas por cromatografia líquida à vácuo.



Fonte: Autora.

4.4.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de planta

Após o teste de CIM, foram retirados com auxílio de micropipetas um volume de 50 µL de cada poço da placa de 96 poços e inoculados através de espalhamento, por meio da alça de *drigalski*, na superfície do meio de cultura AN, em placas de Petri. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas e então examinado o crescimento bacteriano, podendo assim determinar a CBM, ou seja, a concentração do extrato vegetal que não exibiu crescimento bacteriano.

4.5 Bioensaio toxicológico agudo do extrato

Para a realização deste teste, foram utilizados náuplios de *Artemia salina* recém eclodidos como grupo vivo submetido aos efeitos tóxicos dos compostos vegetais, de forma a analisar sua taxa de sobrevivência, em prol disso, os extratos foram pesados e diluídos em solvente Tween 80 e posteriormente em água do mar tratada (inserção e remoção de cloro), nas proporções dispostas na Tabela 1.

Tabela 1: Relações entre as massas e volumes utilizados nos testes de toxicidade dos extratos e fração da folha de *Psidium myrtoides*

Extrato	Concentração (mg/kg)	Reagente (mL)	Massa do extrato (g)	Água do mar (mL)
Controle positivo	1000	2	-	8
Controle negativo	0	0	-	10
Bruto Folha	125	0,25	0,0031	9,75
Bruto Folha	250	0,5	0,0125	9,5
Bruto Folha	500	1	0,05	9
Bruto Folha	1000	2	0,2	8
Fração Diclorometano Folha	125	0,25	0,0031	9,75

Fonte: Autora

No grupo controle, foi utilizado o reagente Dicromato de potássio a 0,33 mM como positivo e a água do mar tratada para o negativo, sendo todas as soluções dispostas em tubos de ensaio, respeitando o volume total de 10 mL por tubo e em triplicata. As concentrações de extrato empregadas para o teste foram: 125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg, já o grupo controle manteve-se em 1000 mg/kg para o positivo e 0 mg/kg para o negativo. Após todos os volumes e concentrações devidamente identificados e preparados, foram adicionadas a cada tubo 10 indivíduos de *A. salina*. Por fim, os tubos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por 24 h. Posto isso, o líquido de cada tubo foi filtrado separadamente em papel filtro e lavados com água do mar para um recipiente limpo com uma parcela mínima de água para ser possível realizar a contagem dos organismos sobreviventes. A CL 50% foi determinada a partir da regressão linear resultante da correlação das taxas de mortalidade e as concentrações dos extratos.

4.6 Análise dos dados

O programa utilizado para análise dos dados foi o BioEstat 5.0, do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, sendo realizada a análise descritiva dos dados, analise de variância seguido do teste de Tukey ($p<0,05$) e regressão linear a partir da correlação entre os dados.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Amostragem e identificação do vegetal

Com base na exsicata enviadas para depósito no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo, foi possível identificar posteriormente a espécie em questão, popularmente conhecida como araçaúna, pelo nome científico *Psidium myrtoides*.

Conforme o exposto por Sousa (2019), a identificação vegetal realizada de forma correta garante novos estudos relacionados aos aspectos das folhagens e frutificações, farmacológicos e até mesmo genéticos, em relação aos diferentes comportamentos aos fatores biótico e abióticos, mostrando assim a grande importância de se realizar esses procedimentos nos representantes vegetais.

Outro ponto a ser citado é que as avaliações taxonômicas são facilitada pelos processo de identificação do vegetal, sendo possível, através dela, determinar um panorama da flora de uma região, os representantes presentes em um inventário, além de contribuírem de forma efetiva para a identificação de espécies com potencias terapêuticos e também toxicológicos e também contribuem de forma efetiva para o armazenamento de amostras da espécie (WIGGERS & STANGE , 2008), sendo importante não só para auxiliar novos estudos de identificação como também preservar os representantes da vegetais de uma região.

Realizar a deposição de amostras nos herbários é uma ação bem vista e de suma importância, porque garante um maior conhecimento da diversidade vegetal de uma região, visto que os representantes naturais vêm sendo explorados e degradados antes mesmo de serem feitos estudos botânicos relacionados a eles, ameaçando assim o patrimônio nacional (MOURA et al., 2021).

Por fim, ter o registro e sua identificação concluídos corretamente, fazem com que seja possível traçar novos estudos utilizando os representantes vegetais,

pelo fato de ser possível analisar dados morfológicos, taxonômicos, sistemáticos, biogeográfico, fenológico e até mesmo da distribuição regional, fazendo com que se tornem peças fundamentais para pesquisas que utilizam exemplares botânicos. (DIAS et al., 2019).

5.2 Rendimento do Extrato Alcoólico

Foram obtidos os extratos alcoólicos brutos das partes vegetais do caule, folhas, flores, frutos e sementes, sendo que para estes foi feita a distinção entre os maduros e os verdes. Posto isso, foi possível determinar o rendimento de cada parte, sendo então dispostos na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento dos extratos alcoólicos brutos dos diferentes segmentos de *Psidium myrtoides*

Amostra vegetal	Rendimento total (%)
Caule	35,53%
Flor	11,81%
Folha	10,21%
Fruta madura inteira	2,02%
Fruta verde inteira	3,06%
Polpa + casca fruta madura	44,20%
Polpa + casca fruta verde	8,58%
Semente madura	9,88%
Semente verde	13,47%

Fonte: Autora.

Com isso, fica claro que o extrato da polpa com casca da fruta madura, apresentou a maior concentração de compostos extraídos, uma vez que ao seu valor de rendimento ter sido o maior (44,20%) em relação a todos os extratos testados neste estudo, fato justificado pelas frutas reunirem grandes quantidades de compostos fenólicos, vitaminas, carotenoides, minerais e fibras (VERRUCK et al., 2018). Seguido do caule, sendo que para este estudo foi utilizada as porções mais jovens do tronco, ou seja, as partes onde haviam grande ação dos meristemas e

também do câmbio vascular na formação dos vasos condutores de seiva (PES & ARENHARDT, 2015), justificando a produção de muitos compostos em razão desses estágios vegetais.

Outra observação importante é o fato de os extratos provenientes dos frutos inteiros terem apresentando valores de rendimentos inferiores aos da polpa com casca e das sementes, fato que pode ser em razão da extração de segmentos menores serem mais eficientes na remoção dos compostos do que das partes mais completas do fruto no mesmo intervalo de tempo, visto que quanto maior a superfície de contato, maior será a velocidade da reação (PIRES & REZZADORI, 2019).

Os processos de extração baseiam-se na soltura de constituintes de uma matéria, de forma a reuni-las em um mesmo concentrado, viabilizando sua utilização e funcionalidades para outros fins. Por essa razão, definir o método e os reagentes a serem empregados neste procedimento, são de extrema importância para alcançar maiores rendimentos e qualidade dos extratos finais (FRANZEN, 2018).

O emprego do etanol é bastante frequente em muitos estudos, devido ao fato de ser um bom extrator, permitir a ação conjunta tanto da extração quanto da transesterificação, além de ser acessível a compra, com base na sua grande produção mundial, e pelo fato de gerarem resíduos de toxicidade reduzida, por ser proveniente de materiais renováveis (ROTTA et al., 2017; BAQUETA et al., 2017).

Já no trabalho de Vicente (2020), os valores de rendimento obtidos para os extratos etanólicos utilizando as folhas do vegetal *Eugenia klotzschiana* (pera-do-cerrado), foram de 16,93% e para o caule, 5,96%, apresentando-se de forma singular, visto que para o extrato bruto das folhas da *P*. *myrtoides*, o valor obtido foi 10,21%, em compensação, para o caule a marca obtida foi de 35,53%, excedendo o obtido para a *E. klotzschiana*, o que pode ser justificado pelos diferentes níveis dos metabólitos secundários que esses vegetais apresentam por conta de a *E. klotzschiana* ter sido proveniente do bioma Cerrado, enquanto a araçaúna ter vindo da Mata Atlântica, visto que as condições ambientais interferem na formação destes compostos (CARNEIRO, 2015; CARNEIRO et al., 2017; TULER et.al., 2019).

É importante dizer que alguns dos metabólitos secundários, são produzidos pelos vegetais como forma de suprir suas necessidades de proteção ações que ameassem sua sobrevivência, sendo que muitos desses compostos tem potencial

empregabilidade como conservantes antimicrobianos (VENCATO et al., 2020). E a amplitude desses compostos é explicada pela produção deles pelos vegetais estar diretamente relacionadas aos efeitos bióticos e abiótico que os vegetais são submetidos (YANG et al., 2018).

No estudo de Chiari (2011), o rendimento obtido no extrato etanólico da goiaba foi de 32,37 %, sendo superior ao obtido para os frutos inteiros de araçaúna, podendo ser justificado pelo fato de serem proporcionalmente diferentes, porém, utilizando apenas a porção da polpa e casca da fruta madura, o rendimento obtido para a *P. myrtoides* foi superior, o que mostra que a separação das partes dos frutos antes do processo de extração contribui significativamente para a extração mais efetiva.

Para os extratos alcoólicos testados por Nerys (2018), de três espécies pertencentes a família Myrtaceae, (*Syzygium cumini, Syzygium malacceense* e *Psidium guineense*), utilizando exemplares das folhas, frutas e caule, os respectivos valores obtidos para os segmentos vegetais foram 9,85%; 9,53% e 5,59%, para a *S. cumini* (azeitona-roxa), para a *S*. *malacceense* (jambo) foi 20,40%, 43,15% e 41,27% nesta ordem e para a *P. guineese* (araçá-do-campo) os valores obtidos foram 19,24%, 24,13% e 2,19%. Em comparação, os rendimentos dos extratos brutos da araçaúna, comportaram-se bem distintos aos valores obtidos por este autor, visto que a porção do caule excedeu o obtido pela azeitona-roxa e pelo araçá-do-campo e foi menor que o do jambo. Em análise aos extratos provenientes das folhas, apenas a azeitona-roxa apresentou valores inferiores ao da araçaúna, fato que pode ser explicado pela diferença dos processos de obtenção dos extratos brutos entre os estudos, por fim os resultados do rendimento da fruta apresentaram-se bem distantes dos obtidos para a *P. myrtoides*, isso pode ter relação com a época da colheita e estágio de desenvolvimento do fruto, visto que para a araçaúna foi apresentada uma diferenciação no rendimento dos frutos maduros e verdes (SILVA et al., 2019).

Somando-se a isso, em análise aos diferentes mecanismos de extração de compostos bioativos que se tem hoje, o estudo de Palsikowski (2020), cita que o método de maceração é bastante utilizado para este fim, atuando diretamente no rompimento das paredes celulares das células vegetais e assim facilitando a retirada

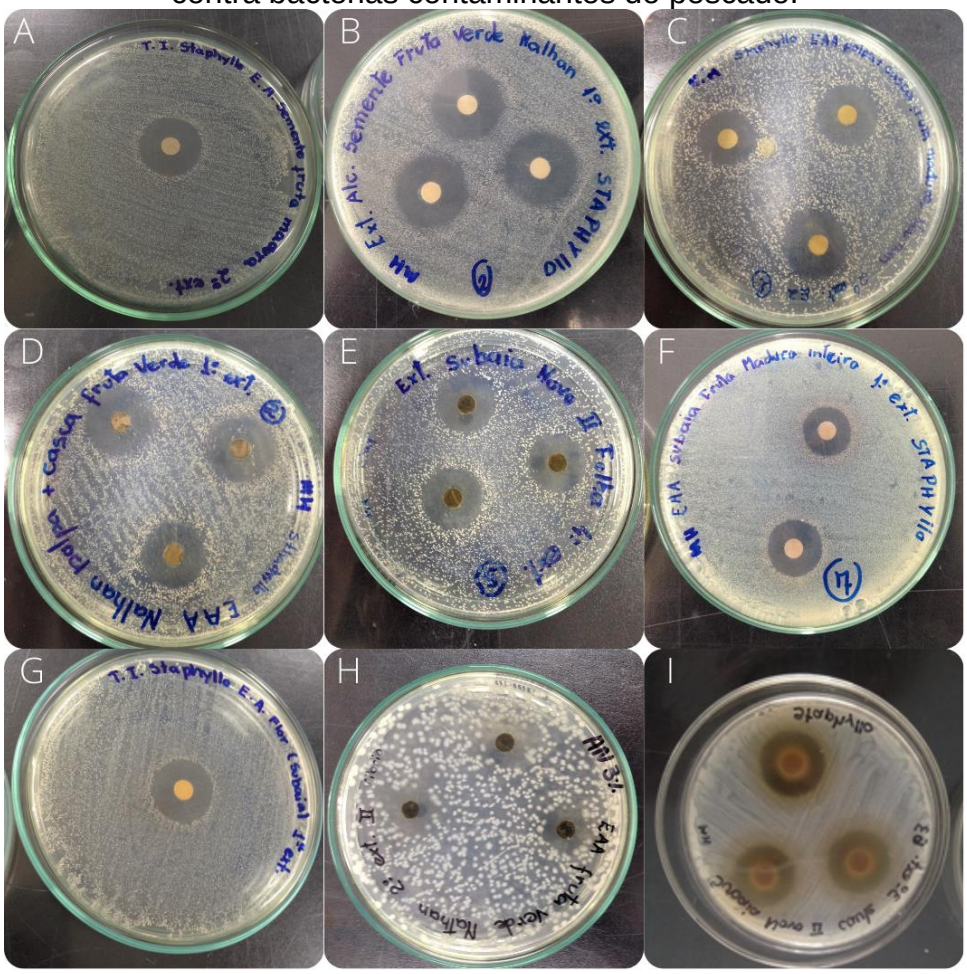
dos compostos fitoquímicos presentes, e por esse motivo foi utilizada para o estudo com os extratos das diferentes parcelas da araçaúna.

5.3 Atividade antibacteriana dos extratos alcoólicos e de suas frações

5.3.1 Atividade inibitória dos extratos vegetais

Tendo em vista que foram realizadas três extrações consecutivas de cada porção vegetal, e em alguns casos pontuais até a 4ª, e todos apresentaram atividade inibitória frente ao menos uma das cepas testadas (Figura 4), os resultados dos valores médios das zonas de inibição gerados por cada solução e também da fração diclorometano da CLV, foram dispostos na Tabela 3.

Figura 4: Atividade inibitória dos diferentes extratos alcoólicos de *Psidium myrtoides* contra bactérias contaminantes do pescado.



A) Extrato da semente da fruta madura contra a *S. aureus*; B) Extrato da semente da fruta verde contra a *S. aureus*; C) Extrato da Polpa + casca fruta madura contra a *S. aureus*; D) Extrato da Polpa + casca fruta verde contra a *S. aureus*; E) Extrato da folha contra a *S. aureus*; F) Extrato da fruta madura inteira contra a *S. aureus*; G) Extrato da flor contra a *S. aureus*; H) Extrato da fruta verde inteira contra a *V. parahaemolyticus* e I) Extrato do caule contra a *S. aureus*.

Fonte: Autora

Tabela 3: Potencial inibitório dos extratos alcoólicos brutos de *Psidium myrtoides*

Halos de inibição médio do extrato bruto (cm)					
Amostra	*E. coli*	*S. aureus*	*B. cereus*	*V. parahaemolyticus*	*S. thyphi*
Caule	0,90 ± 0,42^{c}	0,61 ± 0,20^{b}	0,46 ± 0,17^{ac}	0,50 ± 0,26^{abc}	0,11 ± 0,18^{ab}
Flor	0,60 ± 0,00	0,75 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Folha	0,51 ± 0,15^{ab}	0,38 ± 0,20^{ab}	0,35 ± 0,11^{ac}	0,41 ± 0,29^{ac}	0,00 ± 0,00^{a}
Fruta madura inteira	*	0,55 ± 0,07	*	*	0,40 ± 0,10
Fruta verde inteira	0,20 ± 0,21^{a}	0,24 ± 0,24^{a}	0,36 ± 0,26^{a}	0,20 ± 0,28^{a}	0,01 ± 0,03^{a}
Polpa + casca fruta madura	0,36 ± 0,14^{ab}	0,49 ± 0,18^{ab}	0,33 ± 0,14^{ab}	0,54 ± 0,30^{c}	0,19 ± 0,19^{b}
Polpa + casca fruta verde	0,47 ± 0,29^{ab}	0,51 ± 0,16^{ab}	0,48 ± 0,15^{a}	0,94 ± 0,31^{b}	0,19 ± 0,15^{b}
Semente fruta madura	0,34 ± 0,32^{ab}	0,33 ± 0,33^{ab}	0,13 ± 0,20^{ab}	0,20 ± 0,26^{a}	0,01 ± 0,03^{a}
Semente fruta verde	0,62 ± 0,15^{bc}	0,64 ± 0,21^{b}	0,37 ± 0,19^{ac}	0,93 ± 0,17^{b}	0,08 ± 0,09^{ab}

* Não foi testado. Não foi feito o teste de Tukey ($p<0,05$) para os extratos da flor e da fruta madura inteira por não haver amostra suficiente.
Fonte: Autora.

Com isso é possivel notar que se comparados tanto os extratos provenientes da polpa com casca da fruta madura e verde, como também das sementes provindas dos frutos maduros e verdes, é possível perceber que os representantes provindos do fruto verde apresentam halos inibitórios maiores que os maduros, fato que pode ser explicado pelas grandes concentrações de taninos nos frutos verde, sendo essa substância adstringentes e controladoras na proliferação de fungos e bactérias como também na predação por insetos, e isso tudo deve-se pela propriedade desses compostos formarem complexos com algumas proteínas (LIMA et al., 2014).

Outra observação importante em relação ao resultado obtido foi que a sua variação, comprovados pelos valores do desvio, pode ser justificada pelo fato de as amostras terem sido coletadas em locais diferentes e isso contribui para as distintas produções de metabólitos, principalmente dos secundários por serem responsáveis pela inteiração química do vegetal e o ambiente o qual está inserido (SAMPAIO et al., 2016).

Já, os valores médios resultantes das frações obtidas por CLV a partir do extrato alcoólico da folha, testadas contra a cepa de *S. aureus*, foram 0,3 cm ± 0 na fração proveniente do reagente Diclorometano e as demais frações vindas do Hexano, Acetato de Etila, Metanol e Água Destilada, não apresentaram atividade inibitória, ficando nítido que os compostos antimicrobianos presentes no extraído são de solubilidade intermediária, visto que o Diclorometano em contato com a água, apresenta solubilidade de 13,2 mg/L a 25 º C (NCBI, 2021).

É importante dizer que a escolha das cepas utilizadas se baseou em sua importância para as regras sanitárias do setor de alimentos. A *S. aureus* é um dos maiores patógenos causadores de intoxicações alimentares e tem fácil disseminação, a *E. coli*, é uma bactéria nativa intestinal e quando ingeridas são promotoras de gastroenterites, a *Salmonella*, pela fácil propagação nos suprimentos e também ocasionar doenças alimentares, o *B. cereus*, que também tem sua parcela de contribuição nas DTA, agindo tanto de forma emérica, quanto diarreica, e o *V. parahaemolyticus* por estar diretamente relacionado a distúrbios gastrointestinais, chegando até a eliminação de sangue nas fezes (ÁVILA et al., 2016 ; LOPES, 2020).

A escolha dos solventes utilizados no processo de extração tem domínio direto na concentração e tipologia do composto a ser extraído, principalmente em relação aos metabólitos secundários, com isso, esta etapa é primordial para atender as finalidades de aplicação do extrato final (DIRAR et al., 2019).

Segundo o estudo de Silva e colaboradores (2019), foi realizado o perfil físico químico dos frutos da araçaúna, sendo determinados valores de sólidos solúveis, acidez titulável, pH e concentração de ácido ascórbico, já quanto ao caráter bioativo da fruta foi detectada a presença de carotenoides, flavonoides, antocianinas e fenólicos. Esses componentes apresentam não só um elevado valor nutricional como também funcional, sem contar que a presença de sólidos solúveis e dos

compostos bioativos, conferem ao fruto propriedades preventivas de muitas patologias, justificando assim o bom desempenho antimicrobiano obtido pelos extratos relacionado a esta porção vegetal (SILVA et al., 2019).

No trabalho de Albuquerque e colaboradores (2017), em teste com a *S. aureus*, os extratos alcoólicos das folhas de *Eugenia uniflora* (pitanga), *S. cumini* (azeitona-preta)*, P. guajava* (goiaba) e *S. malaccense* (jambo-vermelho), em diferentes concentrações (25 mg/mL, 50mg/mL e 100mg/mL), apresentaram resultados de inibição, em que a primeira e a segunda planta obtiveram valores com poucas diferenças sendo para a ordem crescente de concentração, 8mm, 10mm e 11mm, e 7mm, 8mm e 10mm, respectivamente, o terceiro representante apontou um resultado intermediário com 0 mm, 7 mm e 8 mm, por fim, a *S. malaccense* não apresentou atividade inibitória, com isso é possível afirmar que os extratos alcoólicos da araçaúna, inibiram de forma mais satisfatória esta bactéria, em comparação a *S. malaccense,* em razão de os halos de inibição serem superiores, porém quanto aos outros exemplares, o resultado foi menor, reforçando que, apesar de pertencerem a mesma família na classificação taxonômica, as propriedades variam de espécie para espécie.

Dentro da medicina popular, destaca-se o uso das plantas medicinais, que apresentam muitos compostos com aplicações terapêuticas como ação anti-inflamatória, tratamento de gripes, distúrbios intestinais, antidiabético, analgésico, infecções, doenças respiratórias e efeito diurético, comprovando a efetividade de seus constituintes frente a muitos patógenos (LIMA & FERNANDES, 2020)

Para a estudo utilizando extrações das folhas do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) e da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*), sendo todas consideradas plantas medicinais, os componentes presentes não apresentaram eficácia no combate ao crescimento da *E. coli*, independente da concentração testada de cada um, porém para a *S. aureus*, apenas a aroeira, barbatimão e erva-baleeira, resultaram em halos de inibição variando de 1 mm a 5 mm, quando presentes, fato que mostra o melhor desempenho da *P*. *myrtoides* quando comparados a esses vegetais, por ter apresentado halos de inibição contra os mesmos patógenos (PINHO et al. 2012).

Os vegetais, alecrim, manjericão, orégano, sálvia e tomilho ganham destaque no Brasil por apresentarem grandes índices de consumo, sendo que os extratos desses representantes vegetais, são constituídos por vários compostos com potenciais fisiológicos dentre eles diterpenos fenólicos, ácidos fenólicos e fenilpropanóides, fazendo com que apresentem inúmeras aplicações (ALVES et al., 2020)

Analisando os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Ocimum basilicum* (manjericão) e a combinação entre eles, em relação à capacidade inibitória do *V. parahaemolyticus*, os resultados obtidos foram 34,2 mm, 0,0 mm e 9,3mm respectivamente (MELLO, 2018). Sendo valores inferiores aos obtidos para a maioria dos extratos alcoólicos de araçaúna, com exceção do orégano. Porém, apesar de apresentarem resultados de inibição, os óleos essenciais, são empregados em outros produtos de modo ainda bem limitado pelo fato de o rendimento ser baixo e por não se ter produtos tão qualificados (DIAS et al., 2021), fazendo com que os extratos alcoólicos sejam alternativas viáveis de utilização com a função antimicrobiana.

No estudo feito por Jafari-Sales e Hossein-Nezhad (2020), o extrato metanólico de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), apresentou-se ineficiente contra a inibição do *B*. *cereus*, já para a *S. aureus* os halos obtidos nas concentrações de 20 mg/mL, 30 mg/mL, 50 mg/mL e 400 mg/mL, foram respectivamente 0,89 mm, 0,89 mm, 0,89 mm e 1,14mm, e para a *E.coli*, sem inibição, 0,83 mm, 1,92 mm e 0,54 mm, nesta ordem. Fato que comprova mesmo utilizando outro tipo de álcool, o extrato etanólico de araçaúna possui uma melhor atuação.

No estudo desempenhado por Mostafa e colaboradores (2018), foram testados os extratos alcoólicos da semente de *Cuminum cyminum* (cominho), contra *B*. *cereus*, *S. aureus*, *E*. *coli* e *S*. *typhi*, e os potenciais inibitórios determinados foram 0 mm, 9,5 mm, 0 mm e 0 mm, respectivamente para as bactérias citadas, o extrato das cascas de *Punica granatum* (romã), resultaram em halos, na mesma ordem, de 16 mm, 18,5 mm, 14,2 mm e 9,7 mm, já, para as flores de *Syzygium aromaticum* (cravo), foram 14,6 mm, 15,8 mm, 11,9 mm e 0 mm, e para as folhas de *Thymus vulgaris* (tomilho), os índices encontrados são 0 mm, 17,6 mm, 0 mm e 0 mm. Com isso é possível dizer que o cominho e o tomilho apresentaram menor resultado em comparação a Araçaúna, com exceção apenas a inibição do *S.aureus*, já os demais

vegetais portaram-se com atividade bactericida superior à da araçaúna, fato que pode ser dado em razão das diferentes concentrações utilizadas para o teste.

Apesar de apresentarem grandes potências antimicrobianos e antioxidantes, os temperos e condimentos, possuem a propriedade de alterar o sabor dos alimentos, fato que deve ser levado em consideração ao seu uso em produtos cárneos, principalmente em pescado, visto que isso pode ser um fator limitante ao amplo consumo do produto (TARCITANO & MESQUITA, 2017).

Gonelimali e colaboradores (2018), avaliaram o desempenho antimicrobiano dos extratos alcoólicos das flores de rosela (*Hibiscus sabdariffa*) e do cravo, e das folhas do alecrim e do tomilho. Os resultados mostraram que a inibição dos extratos de rosela contra as cepas bacterianas foi de: *E. coli*, 21,1 mm, *V. parahaemolyticus* 20,3 mm, para a *B. cereus* 22,2 mm e o *S. aureus* 21,5 mm. Já para o cravo, foi respectivamente, 17,4 mm, 14,7 mm, 18,2 mm e 16,7mm. Em análise aos extratos foliáceos, as alíquotas, para o alecrim, foram nessa ordem, 21,1 mm, sem atividade quanto ao *V. parahaemolyticus*, 19,8 mm para *S. aureus* e *B. cereus*. Por fim, para o tomilho, o desempenho descrito foi 15,9 mm, 13,9 mm,17,3 mm e 16,3 mm respectivamente, tais resultados foram superiores ao da *P. myrtoides*, podendo ser, esta diferença, justificada em razão de os autores utilizarem a metodologia de difusão em ágar e não em disco como foi feito para araçaúna, bem como a diferença entre as concentrações de cada extrato testadas.

Conforme o exposto por Delfino (2020), em testes dos extratos vegetais de moringa a (*Moringa oleifera* Lam) e osmarin (*Helichrysum italicum*) incluídos na formulação de hambúrguer de tilápias, foi possível comprovar que estes extratos modificaram a cor do hambúrguer, fato que pode ocorrer com outros extratos vegetais, frente aos seus vários pigmentos, cabendo realizar alguns processos de despigmentação desses extratos antes de incluí-los nas receitas, pois o efeito visual do produto contribui muito para seu consumo.

No estudo feito por Alves e colaboradores (2020), foi comprovada a ação eficiente dos extratos vegetais empregados em filé de tilápia submetidos aos processos de *sous vide*, de forma que contribuíram para a diminuição do teor de ranço oxidativo do peixe e contribuíram de forma eficiente no controle microbiológico, fazendo com que os filés mantivessem dentro dos padrões legais para consumo.

Tendo em vista que os conservantes alimentares são separados em dois subgrupos (antioxidante e antimicrobiano), sendo este responsável pelo combate da microbiota e aquele no retardo das reações oxidantes e frente aos resultados obtidos pelos extratos das diferentes parcelas da araçúna, é possível identificar o elevado potencial destes compostos serem empregados como conservantes alimentares (NASCIMENTO, 2018).

Para o estudo de Farias (2018), o uso de extrato alcoólico do caroço de manga (*Mangifera indica* Linneau), na conservação de filés de Sarda (*Sarda sarda*), mostrou-se bem eficaz na ação preventiva de formação as bases voláteis, compostos estes com efetiva contribuição aos processos de degradação da carne do pescado. Isso comprova que o uso se extratos vegetais tem sido cada vez mais eficazes no controle das etapas degradantes do pescado.

5.3.2 Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcóolico de *P. myrtoides*

Os dados obtidos na avaliação da CIM foram dispostos na tabela abaixo.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima dos extratos alcoólicos de *Psidium myrtoides* contra o patógeno *Staphylococcus aureus*.

Extrato alcoólico	CIM (ug/ml)
Caule	156,25
Flor	*
Folha	4,88
Fruta madura inteira	*
Fruta verde inteira	2,44
Polpa + casca fruta madura	39,06
Polpa + casca fruta verde	156,25
Semente fruta madura	39,06
Semente fruta verde	2,44

* Não foi testado.
Fonte: Autora.

Posto isso é possível inferir que os extratos que apresentaram menor CIM foram da semente da fruta verde e da fruta verde inteira, fato justificado pelos taninos apresentarem efetiva ação antimicrobiana contra o *S. aureus* (SANTIAGO et al., 2020), porém esse resultado não foi observado na polpa com casca do fruto verde, pois sua concentração foi bem superior (156,25 ug/ml), o que pode ser pelo fato desse

composto estar em maiores concentrações nas sementes, porém isso precisa ser confirmado com testes fitoquímicos dos extratos. O segundo melhor resultado foi obtido pelo extrato das folhas com valor de 4,88 ug/ml, seguidos dos extratos provenientes dos frutos maduros (39,06 ug/ml) e por fim o caule e a polpa com casca da fruta verde com as concentrações mais altas de 156, 25 ug/ml.

Santos (2018), realizou um estudo similar utilizando extratos alcoólicos de diferentes espécies vegetais, dentre elas *Canavalia brasiliensis* Mart (feijão-bravo-do-Ceará), *Cassia excelsea* Schrader (pau-de-velha), *Genipa americana* L. (jenipapeiro), *Copernicia cerifera* Mart. (carnaúba), *Celtis iguanacea* Sarg. (esporão-de-galo.), *Azadirachta indica* (nim), *M. urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão), *Anadenanthera colubrina* Vell. (angico), *Bromelia laciniosa* Mart. (macambira) e *Schinopsis brasiliensis* Engl (braúna), obtendo os valores da CIM para o caule, em teste com *S. aureus*, superiores a 500 µg/mL para a maioria, destoando apenas a *A. colubrina*. com 31,25 µg/mL e a *M. urundeuva* com a concentração de 3,91 µg/mL, com isso é possível inferir uma superioridade dos extratos da araçaúna se comparados a essas plantas provenientes da Caatinga, em relação a inibição do patógeno em questão, visto que o valor obtido é inferior a grande parte, podendo ser justificado pelo uso do DMSO nos extratos de *P. myrtoides*, ele contribui com o desempenho antimicrobiano pelo fato desse solvente ter polaridade elevada e ser aprótico, ou seja, desencadeiam ligações polares com hidrogênios de forma a reprimir precipitações do extrato (MOURA et al., 2019).

Segundo o estudo realizado por Trindade (2019), o óleo essencial da goiaba apresentou atividade inibitória ao crescimento da *S. aureus*, tendo sua CIM igual a 25 µL/mL, fato que comprova a eficiência desse gênero frente a cepa testada, em que para a araçaúna, foi de 4,88 µg/mL, utilizando a mesma porção vegetal das folhas em ambos estudos, sendo possível afirmar que a forma de obtenção dos extratos, seja alcóolica ou em óleo, apresentam atividades inibitórias relevantes.

Já, para a fração originária da cromatografia líquida a vácuo, das folhas da araçaúna, obtida pelo solvente diclorometano, a CIM foi correspondente ao valor de 250 µg/mL.

Analisando os extratos hidroalcóolicos do vegetal *Ficus carica* (figo) e do *Polygala spectabilis* (caamembeca), foi possível determinar que a CIM para este foi

de 1280 µg/mL, enquanto para aquele foi de 320 µg/mL (SPRENGER et al., 2017), sendo ambos superior ao obtido para a araçaúna, podendo ser justificado pela combinação de solventes utilizados para a extração vegetal (água e álcool) no trabalho em questão, fato que não acontece para os extratos da *P. myrtoides*, que utiliza apenas o álcool etílico P.A..

É importante acrescentar que uma das formas da ação antimicrobiana é pela degradação da parede celular do micro-organismo, e dentre os causadores desse processo, estão os compostos fenólicos e flavonoides, podendo ser esse o motivo da eficiência da *P. myrtoides*, visto que é rica nesses compostos (SHUKLA et al., 2017; FERREIRA, 2020)

Para determinação do potencial antimicrobiano de extratos vegetais, a metodologia de microdiluição, foi a melhor, visto que seus resultados possuem confiabilidade e por ser econômico, em relação aos demais testes de antimicrobianos. Por isso foi utilizada para determinação da CIM, ou seja, a menor concentração do extrato com capacidade de inibir visualmente o desenvolvimento microbiano. Sendo que após essa determinação, consequentemente o extrato poderá ser empregado em proporções adequadas para tratamentos e conservação dos produtos (VEIGA, 2016; VIANA, 2019).

Silva (2003) determina que quanto menor forem os valores obtidos pela CIM, maior será sua potência e consequentemente, quanto maior a potência, mais difícil torna para os micro-organismos desenvolverem resistência ao composto.

Outro ponto a ser citado é que obter valores reduzidos das CIM, contribuem para seu uso em menores concentrações em pescado, fato que contribui para uma reduzida alteração na composição centesimal dele, visto que os compostos inseridos como aditivos alimentares modificam as características do alimento em são adicionados (VERAS et al., 2021), fato que deve ser levado em consideração no seu emprego em pescado.

5.3.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de *Psidium myrtoides*.

O resultado obtido nesse experimento mostrou que a porção das folhas teve a CBM de 19,53 µg/mL e as concentrações obtidas para a CBM dos outros extratos alcoólicos vegetais do caule, sementes das frutas maduras e verde, as polpas

com casca das frutas maduras e verde e das frutas inteiras (maduras e verdes), foi superior a 5000 µg/mL. Já, para a fração da CLV, a CBM foi de 1000 µg/mL.

O estudo de Santos (2018) comprova que contra a *S. aureus*, as espécies, *Schinopsis. Brasiliensis* Engl., *Celtis Iguanaea* Sarg. e *Azadirachta indica*, no teste com extrato do caule, somadas ao teste do extrato das folhas de *Caesalpinia ferrea* Mart. e *Anadenanthera colubrina* Vell, não apresentaram atividade bactericida; já, os extratos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão excederam a marca de 500 µg/mL, a *C. iguanacea* Sarg, apresentou CBM em 500 µg/mL e a *M. urundeuva* Allemão, em seu extrato do caule obteve a marca de 250 µg/mL, por fim a *S. brasiliensis* Engl. (extrato da folha) com a marca de 31,25 µg/mL junto a *A. colubrina* Vell. (extrato do caule). A diferença do desempenho das porções vegetais por espécie, pode ser justificada pelo fato da produção dos metabólitos ser diversificada e em proporções distintas, tanto pelas demandas biológicas do vegetal quanto pelos fatores externos (REIS, 2019).

Em relação aos valores da CBM, para os extratos hidroalcóolicos das folhas de *F. carica* (figueira) e *P. spectabilis* (caamembeca), foram de 320 µg/mL e 2560 µg/mL respectivamente (SPRENGER et al., 2017), sendo válido dizer que os valores de CBM comprovam com mais efetividade a CIM, visto que é possível quantificar o crescimento bacteriano pelo cálculo do ufc/mL.

Um ponto importante a ser citado é que o período do ano, a genética e as condições ambientais em que as matérias primas vegetais são colhidas para a finalidade de extrair componentes ativos, marca o tipo de composto e suas concentrações produzidas, porque esses fatorem tem efetiva influência na produção dos metabólitos secundários dos vegetais (MACÊDO et al., 2020), fato que justifica desempenhos divergentes entre as porções utilizadas no estudo com araçaúna .

Para os testes feitos com os extratos vegetais e óleos essenciais da araçá (*P. cattleianum* S.) e pitanga (*E. uniflora* L.), contra o mesmo patógeno utilizado no presente estudo, o desempenho dos extratos se mostraram ineficientes quanto o caráter bactericida, viso que não houve inibição em nenhum dos dois vegetais, porém em contrapartida os valores de CBM obtidos pelos óleos essenciais foram 270 mg/mL e 291,3 mg/mL, respectivamente (GARCIA, 2018).

Para o estudo realizado por Pereira e colaboradores (2017), o extrato de araçá-vermelho (*P. cattleianum* L.) apresentou atividade antimicrobiana moderada para todas as bactérias testadas (CIM 330 µg mL-1), porém este extrato teve atividade bactericida apenas para *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Fato que mostra a importância de se realizar ambos os testes para determinação das duas concentrações mínimas, em função de ser possível determinar a partir da razão entre elas (CIM/CBM), caso o resultado seja igual ou superior a 32, a cepa em questão é denominada tolerante, caso contrário é sensível (FERREIRA, 2019). Sendo então possível dizer que a *S. aureus* foi sensível ao extrato bruto e a fração diclorometano das folhas da araçaúna visto que a razão obtida pelos dois foi de 0,25.

No estudo feito por Schultz e colaboradores (2020), fica efetiva a ação bactericida dos extratos de plantas do gênero *Physalis* frente ao *S. aureus, E.coli* e a *Salmonella* sp., assemelhando-se a araçaúna.

O desempenho do extrato aquoso das folhas de *Acca sellowiana* (goiabeira-do-mato), foi testado por Goronski e colaboradores (2019) e apresentou a CBM igual a 1,5625 mg/mL, tal valor diverge do obtido para a araçaúna.

É sabido que a cadeia de produção do pescado é passível de contaminação a qualquer nível, com isso o emprego de aditivos alimentares como forma de minimizar esse fato é indispensável (BAPTISTA, 2018), e conforme os resultados obtidos tanto da CIM, quanto da CBM, mostram que os extratos de *P. myrtoides*, apresentam efetiva ação frente a *S. aureus*, o que os tornam possível contribuinte para essa etapa, porém a sua efetiva aplicação carece de mais testes.

5.4 Efeito toxicológico do extrato

Sabendo que a adição de alguns conservantes nos alimentos é restrita pelos níveis de toxicidade e potencial alergênicos, este teste foi desempenhado, como certificação de que os extratos da *P. myrtoides*, possam ser utilizados como um conservante (LIMA, 2019), devido ao fato de haver a busca por essas alternativas naturais e menos agressivas (MACÊDO et al., 2020).

Este teste faz-se necessário para determinar a seguridade do composto, visto que determina a capacidade bioativa dele, através das análises comportamentais e/ou letais que o produto em teste desencadeia nos organismos expostos a ele. Com

isso, o uso de *A. salina*, como indivíduo teste, tem sido bastante comum entre as pesquisas, não só pelo fato de gerar bons resultados, como pela sua facilidade no manejo e cultivo (DANTAS et al., 2020).

É importante saber que os testes de toxicidade não garantem o um valor absoluto de toxicidade de um composto para humanos, pois as testagens são feitas com outros seres vivos, porem o emprego desses testes são fundamentais para avaliar o caráter tóxico dos compostos e de suas concentrações, frente aos organismos utilizados, sendo assim possível determinar os valores de toxicidade da amostra (COSTA et al., 2008).

Segundo o exposto por Aun e colaboradores (2011), os aditivos alimentares devem passar pelos testes de necessidade tecnológica, para garantir a seguridade do composto e em alguns casos devem passar pelos serviços de aprovação e adição nas legislações vigentes para alimentos, podendo haver controle nas concentrações permitidas dependendo do composto e caso isso não o corra a concentração utilizada deve ser a suficiente para alcançar o efeito esperado no alimento.

Foi observado que após 24 h da exposição das *A. salina* aos diferentes tipos de soluções os valores dispostos na Tabela 5.

Tabela 5: Taxa de mortalidade média expressa em números de *Artemia salina* mortas após exposição às amostras de extrato bruto e da fração diclorometano das folhas de *P. myrtoides*

Extrato	Concentração (mg/kg)	Mortalidade média	Taxa de mortalidade (%)
Controle positivo	1000	7,67 ± 1,5275	27.78
Controle negativo	0	6,00 ± 1,0000	-
Bruto Folha	125	7,67 ± 0,5774	27.78
Bruto Folha	250	5,67 ± 4,0415	- 5.56
Bruto Folha	500	7,67 ± 2,5166	27.78
Bruto Folha	1000	8,33 ± 2,0817	38.89
Fração Diclorometano Folha	125	1,00 ± 0,00	- 83.33

Fonte: Autora.

Os valores negativos obtidos para a taxa de mortalidade devem-se em relação ao comparativo com a média dos valores encontrados no grupo controle negativo com as médias de cada teste, sendo assim mostrada sua baixa mortalidade em comparação a este grupo.

Esse tipo de testagem, vem sendo empregado em muitos estudos pelo fato de ser acessível financeiramente, rápida e sem muitos entraves, sendo possível determinar a CL 50%, das substâncias frente a *A. salina* e assim avaliar a toxicidade da amostra, visto que a CL 50% abaixo de 1000 ppm, infere às substâncias a classificação tóxica (MAIA et al., 2018).

Segundo o estudo de Amarante e colaboradores (2011), a elevada toxicidade, apresentada pelos extratos vegetais e suas derivações, obtidas a partir do teste com *A. salina*, em relação as atividades biológicas, são considerados indicativos da presença de muitos compostos, e até mesmo a presença de componentes bioativos, sendo necessário realizar as análises fitoquímicas para melhor determiná-las.

Com isso foi possível determinar que a CL 50% do extrato bruto das folhas da araçaúna foi de 287,53 mg/kg, considerada tóxica moderada (AMARANTE et al., 2011), fato que pode estar relacionado ao extrato não ter passado pelos processos de purificação e separação, dentre eles a cromatografia líquida a vácuo (PAULINO, 2020), sendo uma das explicações para este resultado. Outra justificativa pode ser pelo fato das condições morfoclimáticas também influenciarem nos efeitos tóxicos dos vegetais conforme exposto por Dantas e colaboradores (2020).

Quanto a CL 50% da fração diclorometano das folhas, não foi possível estipular, devido ao fato de ter sido testado o efeito tóxico apenas em uma concentração, justificado pelo cálculo da regressão linear simples determinar uma correlação entre dados, ou seja, descrevendo o comportamento de uma variável independente em relação a outra variável dependente dela, necessitando de mais dados para sua efetiva confirmação (QUEIROZ, 2020). Com isso, a fração diclorometano pode comportar-se de forma distinta, ou seja, não sendo tóxica, por ser um extrato mais purificado do que o bruto.

Para o estudo similar feito com extrato etanólico de jambo, os resultados obtidos para as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL, foi de mortalidade de 83,3 %, 30 %,16,6 % e 10 %, respectivamente (FREITAS et al.; 2019), o que mostra uma similaridade nos valores obtidos na mortalidade média nas maiores concentrações testadas tanto com araçaúna quanto com o jambo, porém

quando a taxa de mortalidade a *P. myrtoides* sobressaiu, visto que sua porcentagem foi bem inferior a 83,3%, mostrando seu efeito menos tóxico que o deste vegetal.

Já, no estudo de Senigalia e colaboradores (2020), foram testadas diferentes concentrações dos extratos aquosos das cascas de *A. colubrina* (anginco)*, M. rundeuva* (aroeira)*, Hymenaea stilbocarpae* (jatobá) e *Copaifera langsdorffii* (copaíba) também usando *A. salina*, e o efeito notado para a anginco foi que conforme as concentrações dos extratos foram aumentando, a taxa de mortalidade também cresceu, sendo que na concentração de 1000 µg/mL, a taxa de mortalidade atingiu as marcas de 47% e a CL 50% igual a 923,10 µg/mL, para a aroeira, o resultado obtido foi de 34% de *A. salina* mortas na concentração de 30 µg/mL e na de 1000 µg/mL, 74%, estando sua CL 50% nas marca de 263,10 µg/mL. A taxa de mortalidade da *A. salina*, obtida pelos extratos do jatobá, foi 44%, também na concentração de 1000 µg/mL e sua CL 50% foi de 1050,22 µg/mL, por fim, para a copaíba, os valores das taxas de mortalidades na maior concentração e da CL 50% foram respectivamente, 40% e 1380,76 µg/mL. Em comparação a isso, os extratos da araçaúna apresentaram taxa de mortalidades inferiores aos extratos testados, porém, sua concentração letal superou as marcas do extrato de aroeira, comprovando sua menor toxicidade em relação a estes extratos.

Já Freitas e colaboradores (2018), obtiveram no experimento de avaliação da toxicidade frente ao mesmo crustáceo, para o extrato da entrecasca da *M. urundeuva* (aroeira), o padrão de toxicidade elevada, visto que atingiu as marcas de 100% na concentração de 1000 µg/mL, fato que não ocorreu para o extrato bruto de araçaúna, comprovando sua melhor atuação se comparado a este extrato.

Em testes com joaninha (*Coccidophilus citrícola*), os extratos de araticum (*Annona crassiflora*) e barbatimão (*S. adstringens*) nas diferentes concentrações estudadas (10% e 20%), apresentaram a taxa de mortalidade de 18,33 %, 18,33% e 10%, 16,66%, nesta ordem e no controle, a taxa foi de 5% (DANTAS et al., 2019), ou seja, bem inferiores aos da araçaúna, fato que pode ser explicado pelo fato da *A. salina* ser mais sensível que a *C. citrícola*.

As folhas de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), em seu extrato hidroalcóolico, foram testadas para a concentração de 1000 mg/L e foi obtido um valor de 50% para a taxa de letalidade da *A. salina*, seguido da concentração de 100 mg/L, com o índice

de 23% e por fim, o teste com 10 mg/L, atingiu a marca de 0% de mortalidade de *A. salina* (ROSA et al., 2020). Fato que mostra um melhor desempenho da araçaúna frente os valores das taxas de mortalidades obtidas serem inferiores apesar das concentrações testadas serem superiores as utilizada por eles.

No trabalho de Dionísio e colaboradores (2018), ao testar o efeito tóxico do extrato concentrado de carotenoides de caju (*Anacardium occidentale*), obtiveram como valor resultante a concentração de 1,75 mg/mL, referentes as CL 50%, ou seja, bastante tóxico, fato que pode remeter ao grupo dos carotenoides uma grande contribuição no efeito de toxicidade dos extratos vegetais.

6 CONCLUSÃO

Após realizada a análise dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que os extratos de *P. myrtoides*, atuam de forma eficaz no controle microbiano, devido a seus compostos, com isso pode tornar-se uma alternativa ou até mesmo contribuir com alguns de seus componentes para o desenvolvimento de novos conservantes alimentares naturais.

Seu rendimento manteve-se próximo aos valores obtidos em muitos estudos, mostrando-se de acordo com o comportamento dos extratos vegetais em geral, ou seja, sua extração mostrou-se viável.

Os metabólitos da araçaúna mostraram resultados positivos quanto a fração diclorometano, determinando seu caráter de polaridade reduzida na ação antimicrobiana, fato que contribui com o melhor desenvolvimento de extração e aplicação desses compostos, reduzindo o gasto desnecessário de outros reagentes.

Todas as porções vegetais testadas apresentaram efeito no controle da *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, o que reforça o seu elevado potencial de aplicação com essa finalidade nos alimentos.

Por fim, a toxicidade do extrato bruto das folhas foi tóxico moderada, cabendo novos estudos para identificar o perfil fitoquímico desse extrato e também realizar novos testes para purificação dos extratos brutos, a fim de avaliar o potencial de toxicidade apenas dos compostos antimicrobianos.

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, F. H. C. et al. **Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos das folhas de espécies da família Myrtaceae frente às cepas de bactérias de interesse.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 16, n. 2, p. 139-145, 2017. Disponível em: < https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/17989/0>. Acesso em 03 de março de 2021.

ALVES, L. F. S.; et al. **Use of natural antioxidants in sous vide tilapia fillet**. Bol. Ind. Anim., v. 77, 2020. Disponível em: <http://iz.sp.gov.br/bia/index.php/bia/article/view/1694/1534>. Acesso em 28 de março de 2021.

AMARANTE, C. B.; et al. **Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*).** Acta Amaz., v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672011000300015>. Acesso em 05 de março de 2021.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos Fenólicos Em Alimentos - Uma Breve Revisão**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 30 de março de 2020.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Guia para determinação de prazos de validade de alimentos**. 116 ed., v. 1. ANVISA, 2018. 76 p. Disponível em :<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5056443/Guia+16_2018+Prazo+de.pdf/e40032da-ea48-42ff-ba8c-a9f6fc7af7af#:~:text=A%20determina%C3%A7%C3%A3o%20do%20prazo%20de,20%20de%20setembro%20de%202002.>. Acesso em 09 de julho de 2020.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Guia de Procedimentos para Pedidos de Inclusão e Extensão de Uso de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação na Legislação**

Brasileira. Brasília-DF, 2015. Disponível em :< http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Guia+de+Procedimentos+para+Pedidos+de+Inclus%C3%A3o+e+Extens%C3%A3o+de+Uso+de+Aditivos+Alimentares+e+Coadjuvantes+de+Tecnologia+de+Fabrica%C3%A7%C3%A3o+na+Legisla%C3%A7%C3%A3o+Brasileira.pdf/ad2f1a36-276c-4115-ba6b-62ccf3305400>. Acesso em 01 de junho de 2020.

ARAÚJO, D. A. F. V.; SOARES, K. M. P.; GÓIS, V. A. **Características gerais, processos de deterioração e conservação do pescado**. Revista PUBVET, v. 4, n. 9, ed. 114, art. 771, 2010. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/uploads/e296f4bb956d2a80873ae0e398958f5e.pdf>. Acesso em 08 de julho de 2020.

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGONDI, R. C.; MOTTA, A. A. **Aditivos em alimentos**. Rev. bras. alerg. imunolpatol., vol. 34, n. 5, p. 177 – 186, 2011. Disponível em: <http://aaai-asbai.org.br/detalhe_artigo.asp?id=57>. Acesso em 29 de março de 2021.

ÁVILA, M. O.; et al*.* **A importância do controle das condições microbiológicas e higiênico sanitárias na prevenção de doenças transmitidas por alimentos - uma revisão de literatura.** Revista Expressão Científica, v. 1, n. 1, p. 1 -12, 2016. Disponível em: https://aplicacoes.ifs.edu.br/periodicos/index.php/REC/article/view/55>. Acesso em 03 de março de 2021.

BAPTISTA, R. C. **Pacu, patinga and tambacu: perception of safety, study of microbiological behavior by predictive modeling and metagenomic and development of a mixture of natural antimicrobials for their preservation**. 227 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2018. Disponível em: < http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/350119/1/Baptista_RafaelaDeCarvalho_D%20.pdf>. Acesso em 19 de março de 2021.

BAQUETA, M. R.; et al*.* **Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal casca de café. Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n. 2, p. 68-89, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Fernanda-Leimann-2/publication/320957484_Extracao_e_caracterizacao_de_compostos_do_residuo_ve

getal_casca_de_cafe/links/5a0465b0aca272b06cacc6db/Extracao-e-caracterizacao-de-compostos-do-residuo-vegetal-casca-de-cafe.pdf>. Acesso em 02 de março de 2021.

BARBOSA, V. F. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo***. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87981/barbosa_vf_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 12 de julho de 2020.

BARROS, D. M.; et al. **Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares**. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 40476-40491, 2020. Disponível em: < https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/12158/0>. Acesso em 09 de julho de 2020.

BARROS, F. A. L.; et al. **Características morfométricas, rendimentos de cortes e composição centesimal do híbrido tambacu**. Revista Agrarian, Dourados, v. 12, n. 43, p. 89-96, 2019. Disponível em: <http://ojs.ufgd.edu.br/index.php/agrarian/article/view/8132>. Acesso em: 27 junho 2020.

BERNARDES, C. D.; TULER, A. C.; FERREIRA, A.; et al. **Transferability of *Psidium microsatellite loci in* Myrteae (Myrtaceae): a phylogenetic signal**. Revista Euphytica, v. 214, n. 105, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-018-2195-2>. Acesso em 09 de julho de 2020.

BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A. **Avaliação das características morfométricas corporais, do rendimento de cortes e composição centesimal da carne do armado (*Pterodoras granulosus*)**. Boletim do Instituto da Pesca, v. 34, n. 2, p. 221-229, 2008. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/34_2_221-229.pdf>. Acesso em 08 de julho de 2020.

BRASIL, Agencia nacional de vigilância sanitária. **Instrução normativa n° 60 de 23 de dezembro de 2019,** que estabelece as listas de padrões microbiológicos para

alimentos. Diário oficial da união, Brasília, DF, p. 133, de 26 de dezembro de 2019. Seção 1. Disponível em: < https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em 24 de março de 2021**.**

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997**, que trata sobre os regulamentos técnicos e os aditivos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 164, de 28 de outubro de 1997. Seção 1. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0540_27_10_1997.html>. Acesso em 02 de março de 2021.

BRASIL. Atos do poder executivo. **Decreto nº 9013, de 29 de março de 2017**, que regulamentou a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, nº 62, p. 3, de 30 de março de 2017. Seção 1. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm>. Acesso em 02 de fevereiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Decreto nº 10.468 de 18 de agosto de 2020,** que altera o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário oficial da união, Brasília, DF, n° 159, p. 5, de 19 de agosto de 2020. Seção 1. Disponível em: < https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=19/08/2020&jornal=515&pagina=5&totalArquivos=116>. Acesso em 22 de março de 2021.

CARNEIRO, N. S. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante da polpa e óleo essencial da pera do cerrado (*Eugenia klotzschiana* Berg.)**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) — Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2015. Disponível em: < https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/42>. Acesso em 05 de março de 2021.

CARNEIRO, N. S.; et al*.* **Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg**

(Myrtaceae). An. Acad. Bras. Ciênc., v. 89, n. 3, p. 1907-1915, 2017. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652017000401907&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 04 de março de 2021.

CHIARI, B. G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L**. 137 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/88598>. Acesso 19 de março de 2021.

CHRIST-RIBEIRO, A. et al**. Compostos fenólicos extraídos de fontes naturais aplicados como conservadores em massas de pizza**. Revista de Ciência e Inovação, v.1, n.1, p.129-138, 2016. Disponível em: <http://periodicos.iffarroupilha.edu.br/index.php/cienciainovacao/article/view/70>. Acesso em: 05 de maio de 2020.

CRIBB, A. Y.; SEIXAS FILHO, J. T.; MELLO, S. C. R. P. **Manual técnico de manipulação e conservação de pescado**. 1 ed. (EMBRAPA) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018. 119p. Disponível em:< https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1110125/manual-tecnico-de-manipulacao-e-conservacao-de-pescado>. Acesso em 26 de julho de 2020.

COSTA, C. R.; et al. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação.** Quím. Nova, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700038&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 de março de 2021

DAMACENA, S. S. **Qualidade microbiológica, veiculação de bactérias resistentes e caracterização genotípica do pescado comercializado em feiras livres em municípios do Recôncavo da Bahia**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019. Disponível em: <http://www.repositorio.ufrb.edu.br/handle/prefix/1087>. Acesso em 17 de julho de 2020.

DANTAS, D. L..; SOUSA, A. P. M. de.; COSTA, J. D..; OLIVEIRA, J. A. M..; ALMEIDA, A. F. de.; APOLINÁRIO, M. de O.; SANTANA, R. A. C. de.; CAMPOS, A. R. N. **Toxicological study of seeds *Moringa oleifera* Lam. using the *Artemia salina***

Leach test. Research, Society and Development, v. 9, n. 9, p. e457997332, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/7332>. Acesso em 06 de março de 2021.

DANTAS, P. C.; et al*.* **Toxicidade de extratos vegetais em *Coccidophilus citrícola* (brèthes, 1905) (coleoptera: coccinellidae). Braz. J. of Develop**., v. 5, n. 3, p. 2060-2067, 2019. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/1217/1082>. Acesso em 04 de março de 2021.

DANTAS FILHO, J. V.; et al*.* **Cadeia do pescado: S*almonella* spp. como agente contaminante**. Revista Ciência e Saúde Animal, vol. 2, 2020. Disponível em: <http://revistas.icesp.br/index.php/CSA/article/view/983>. Acesso em 25 de julho de 2020.

DELFINO, L. A. **Obtenção, caracterização e aplicação dos extratos de moringa e osmarin em hambúrguer de tilápia**. 37 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do sul, 2018. Disponível em: < https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/2908/1/DELFINO.pdf>. Acesso em 28 de março de 2021

DESLANDES, A. A. A. Congresso Nacional De Iniciação Científica, 15º., 2015, Ribeirão Preto. **Anais** [...]. Ribeirão Preto: SEMESP, 2015. 9 p. Tema: Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias e Microbiológicas de Pescado Comercializado no Município de Barra Mansa, RJ. Disponível em: <http://conic-semesp.org.br/anais/files/2015/trabalho-1000020880.pdf>. Acesso em 09 de julho de 2020.

DIAS, A. L. B.; et al. **Influência da idade, habitat e técnica de extração do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg**. Trabalhos nas áreas de fronteira da química, ed. 2, cap. 2, p. 14 – 23, Atena, 2021. Disponível em: < https://www.atenaeditora.com.br/post-artigo/44764?__cf_chl_captcha_tk__=dbef6eb304063e372e7cbd13f763f0485f9fe4e8-1616159111-0-Ab2t6m3oMbhhv87H_mfVkFLpXmhHon4sJr0ifqmM4X50W6ekzLTEBmNP5IhS0x_Dp3a-q7ggcgCSiCrc-

mBsf0JIUsDHimn5FIt4I5y8G7CA11t6yXR3Vm4Si3CRkOp4ALt5WRpwsjCHn09AcC4ni3y0I_pgp5u8J-ZO785pp44fd0gOcVTOsbolZTg2AnOA7b4h2pge4G_aYq85IRo1RWRPxQvEYplLyNr1Z5jqdHM-3RjRMs_jx0EwrR-iG9Ddv-zfSIuhJyAbxbReKrwZluZL-YjTfZQ5JekgvvkHhbXh8GU-tvFZtsmXsTmIRHT26MfYwK7wc7i02rgCiDYgW7A_nxMbJDeVUIrmp3-TWkqDP8I1EDDyPwWc9iMAYF48cXZ80PQDyCiDrCqgwv02JgqOsu-joPt1eh3zri2RN8fvvk_PSTAYOix6Kit2z8Twg6w15GHtF4ny1IiDdAAz8iIov1Dzp62haeNC_DZCj-iY4vSz16HxYOB2iWJhYym_Lxl6goHqILqo1rBMMMfSJXJj3BRPZ0EX-UcCY3tqxuvR5O03XfdrysDPPadZ-pk-UA >. Acesso 19 de março de 2021.

DIAS, K. N. L.; et al. **A importância dos Herbários na construção de conhecimento sobre a diversidade vegetal.** Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. p.25-35, v.11, n.1, 2019. Disponível em: <http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/11161/7590>. Acesso 19 de março de 2021.

DIONÍSIO, A. P.; et al*.* **Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju: avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina*.** Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, 23 p., 2018. Disponível em: < https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1091917/1/BPD18011.pdf>. Acesso em 05 de março de 2018.

DIRAR, A.I.; ALSAADI, D.H.M. WADA M., MOHAMED, M.A., WATANABE, T., DEVKOTA, H.P. **Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants**. South African Journal of Botany, v. 120, p. 261-267, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629918308950>. Acesso em 04 de março de 2021.

DUTTA M. K.; ISSAC A.; MINHAS N.; SARKAR B. **Image processing-based method to assess fish quality and freshness**. **Journal of Food Engineering**, v. 177, p. 50-58, 2016. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877415300881?casa_token=-bZYSz5vPLgAAAAA:vKhQ6tk6hey7aMfdYKLzcexOXS7OGJ-

CXy5SMWmfACIjNLZChYWCm-JGWdEHePjM88lMw1bXe7yz>. Acesso em 12 de julho de 2020.

FARIAS, T.C. **Atividade antimicrobiana de extrato alcoólico de caroço de manga (*Mangifera indica* L.) no controle de micro-organismos contaminantes do pescado**. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Piúma, Piúma, 2018.

FERRAZ, R. R. N.; et al. **Investigação de surtos de doenças transmitidas por alimentos como ferramenta de gestão em saúde de unidades de alimentação e nutrição.** Revista RACI, v. 9, n. 19, 2015. Disponível em: <https://www.bage.ideau.com.br/wp-content/files_mf/caac2655456404a794b8fb2390d1bde9269_1.pdf>. Acesso em 17 de julho de 2020.

FERREIRA, E. M., et al. **Alterações sensoriais, microbiológicas e químicas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e do peixe-serra (*Scomberomorus brasiliensis*) desembarcados em portos no Maranhão. Brazilian Journal of Development,** vol. 6, nº 5, p. 26662 - 26676, 2020. Disponível em:<https://ww.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/9882/8307>. Acesso em 02 de fevereiro de 2021.

FERREIRA, F. B. **Extração e purificação de compostos bioativos de cubiu (*Solanum sessiliflorum*), camu-camu (*Myrciaria dubia*) e araçá-roxo (*Psidium myrtoides*) utilizando filtração por membranas com e sem promotores de turbulência**. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

FERREIRA, R. L. A.; CERQUEIRA, R. M.; CARDOSO JUNIOR, R. C. **Análise da identificação botânica em inventários florestais de planos de manejo sustentáveis no oeste paraense**. Nature and Conservation, v.13, n.3, p.136-145, 2020. Disponível em: <http://sustenere.co/index.php/nature/article/view/CBPC2318-2881.2020.003.0014/2116>. Acesso 19 de março de 2021.

FRANZEN, F. L. **Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração.** Acta Iguazu, v.7, n.1, p. 9-21, 2018. Disponível

em: <http://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/16765/12516>. Acesso em 02 de março de 2021.

FREITAS, R. F. et al. **Perfil fitoquímico, ensaio microbiológico e toxicidade frente a *Artemia salina* do extrato da entrecasca da *Myracrodruon urundeuva* A.** Biota Amazônia, v. 8, n. 3, p. 24-27, 2018. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/3590>. Acesso em 05 de março de 2021.

FREITAS, V. M.; CÂNDIDO, W. P.; PIRES, C. G. DE O.; DA SILVA, B. R.; NETO, A. C. N.; ROMÃO, N. F.; VALLEJO, N. M. **Avaliação da atividade toxica e citotóxica de extratos da planta *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry**. South American Journal of Basic Education, Technical and Technological, v. 6, n. 1, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/2253>. Acesso em 04 de março de 2021.

FURLONG, E. B.; BASTOS, A. L.; BAISCH, A. L. M. **Caracterização química de pescados empregados para tratamento de Asma brônquica na Região Sul do Rio Grande do Sul**. Seminário: Ciências Agrárias, v. 27, n. 3, p. 415-422, Londrina: UEL; 2006. Disponível em:<http://repositorio.furg.br/handle/1/370?show=full>. Acesso em 27 de junho de 2020.

GALIMOV, E. R.; et al. **Coupling of *rigor mortis* and intestinal necrosis during *C. elegans* organismal death.** Revista Cell Reports, v. 22, p. 2730–2741, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124718302316>. Acesso em 25 de julho de 2020.

GALO, G. T.; LIMA, A. C. D. S.; MACHADO, K. M.; VIEIRA, L. B.; MARTINS, V. C.; FERREIRA, N. L.; LUCARINI, A. C. **Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*Allium ceppa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural**. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 1, p. 0153-0162, 2018. Disponível em: < https://periodicos.ufv.br/jcec/article/view/2501>. Acesso em 09 de julho de 2020.

FERREIRA, M. A. M**. Tolerância induzida por drogas: efeito da associação in vitro de antimicrobianos em *Stenotrophomonas maltophilia*.** 85 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Espírito Santo, 2019. Disponível em: <http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_11338_Disserta%E7%E3o%20Preliminar%20-%20Mariana%20Abou%20Mourad%20Ferreira.pdf>. Acesso em 19 de março de 2021.

GARCIA, M. O. **Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de araçá (*Psidium cattleianum* S.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) sobre patógenos de origem alimentar**. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018. Disponível em: < http://guaiaca.ufpel.edu.br/bitstream/prefix/4120/1/Disserta%c3%a7%c3%a3o_garcia_marcelle_oliveira.pdf>. Acesso em 04 de março de 2021.

GONELIMALI, F. D.; et al. **Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms**. Frontiers in Microbiology, v. 9, n. 1639, 2018. Disponível em: < https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01639/full>. Acesso em 03 de março de 2021.

GORONSKI, F; et al. Jornada de Estudos Farmacêuticos, XVIII, 2019. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. **Anais** [...]. Edifapes, 2019. 60 p. Tema: Avaliação da atividade antibacteriana da fração aquosa do extrato das folhas de *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. Disponível em: < https://www.uricer.edu.br/site/publicacoes/ANAIS_Jornada_Academica_2019.pdf#page=15>. Acesso em 04 de março de 2021.

JAFARI-SALES, A.; HOSSEIN-NEZHAD, P. **Antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* methanolic extract on *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in laboratory conditions. Journal of Medicinal and Chemical Sciences**, v. 3, p. 103-108, 2020. Disponível em: < http://www.jmchemsci.com/article_92733_514743a00af5ee63fa700fbb3d51d94a.pdf >. Acesso em 03 de março de 2021.

LIMA, B. B.; FERNANDES, F. P. **Uso e diversidade de plantas medicinais no município de Aracati – CE, Brasil. Journal of Applied pharmaceutical sciences**, vol. 7, p. 24-42, 2020. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Felipe-Fernandes-

2/publication/340082226_Uso_e_diversidade_de_plantas_medicinais_no_municipio_de_Aracati_-CE_Brasil/links/5e762540a6fdcccd6213db24/Uso-e-diversidade-de-plantas-medicinais-no-municipio-de-Aracati-CE-Brasil.pdf>. Acesso em 28 de março de 2021.

LIMA, C.M.P. et al. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr**. Rev. bras. plantas med., v. 16, n. 4, p. 832-838, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000400008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 27 de março de 2021.

LIMA, M. B. M. **Análise comparativa da eficácia antibacteriana de conservantes naturais em formulações caseiras de xarope à base de *Acanthospermum hispidum* DC, Asteraceae**. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade Pernambucana de Saúde, Pernambuco, 2019. Disponível em: <http://tcc.fps.edu.br/handle/fpsrepo/545>. Acesso em 09 de julho de 2020.

LIMA, M. F. F.; et al. **Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* Leach de espécimes vegetais pertencentes à caatinga. Braz. J. Hea. Rev.,** v. 2, n. 6, p. 5950-5963, 2019. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/5449/4971>. Acesso 19 de março de 2021.

LOPES, B. C. **Análises bacteriológicas de vibrios e exame presuntivo no camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema semi-intensivo de baixa salinidade.** 44 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal Rural do Semi Árido, Mossoró, 2020. Disponível em:<https://repositorio.ufersa.edu.br/bitstream/prefix/5543/1/BeatrizCL_DISSERT.pdf>. Acesso em 03 de março de 2021.

MACÊDO, D. G.; et al. **Seasonality influence on the chemical composition and antifungal activity of *Psidium myrtoides* O. Berg. South African Journal of Botany**. v. 128, p. 9-17, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629919305307>. Acesso em 09 de julho de 2020.

MACHADO, T. M.; et al. **Fatores que afetam a qualidade do pescado na pesca artesanal de municípios da costa sul de São Paulo, Brasil**. Boletim do Instituto da Pesca, v. 36, n. 3, p. 213 – 223, 2010. Disponível em:<https://www.pesca.sp.gov.br/36_3_213-223rev.pdf>. Acesso em 27 de junho de 2020.

MACIEL, E. S.; et al. **Quality attributes related to the consumption of fish in the city of Corumbá, MS, Brazil**. Boletim do Instituto de Pesca, v. 41, n. 1, p. 199 - 206, 2015. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/41_1_199-206>. Acesso em 27 junho de 2020.

MACIEL, M. J.; et al. **Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante.** Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.), v. 71, n. 3, 2012. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552012000300005&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 02 de março de 2021.

MAIA, A. B.; et al. Colóquio de Estudos Ambientais do Bioma Caatinga, 2º, 2018, Quixadá. **Anais**[...]. IFCE, 2018, 6 p. Tema: Testes de toxicidade com *Artêmia salina* e sua importância no controle de parâmetros ambientais. Disponível em: <http://prpi.ifce.edu.br/nl/_lib/file/doc2771-Trabalho/Resumo%20expandido%20PDF.pdf>. Acesso em 05 de março de 2021.

MARQUES, M. I. S. **Os macros e micronutrientes do pescado: recomendações, consumo e benefícios aliados à dieta mediterrânica.** Dissertação (Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar) - Instituto Politécnico de Viseu, Viseu, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/5081/1/TESE%20MQTA%20IVONE%20MARQUES%20VERS%c3%83O%20DEFINITIVA%20%281%29.pdf>. Acesso em 23 de março de 2021.

MELLO, G. S. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum* frente a *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* e sua aplicação em filés de *Mugil platanus*.** 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018. Disponível em:

<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2018/10/Greyce-Silveira-Mello.pdf>. Acesso em 03 de março de 2021.

MELO, E. S.; et al. **Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão.** Revista PUBVET, v. 12, n. 10, a. 191, p.1-9, 2018. Disponível em: < https://www.pubvet.com.br/uploads/8f4bab59148df2d67fa3e447190e2835.pdf>. Acesso em 17 de julho de 2020.

MOSTAFA, A. A.; AL-ASKAR, A.A.; ALMAARY, K. S.; DAWOUD, T. M.; SHOLKAMY, E. N.; BAKRI, M. M. **Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases**. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 361-366, 2018. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1319562X17300773?token=B814A9ED378134C7C069BE859DD576DEAE5DA92F3FFA3B79146217BCE12D24794B522993D409170FEB22152FB1499C6E>. Acesso em 03 de março de 2021.

MOURA, A. C.; et al. **Atividade antibacteriana de extrato aquoso da casca de noz-pecã [*Carya illinoinensis* (Wangenh.) C. Koch].** Faz Ciência, v. 21, n. 34, p. 88 - 101, 2019. Disponível em: < http://saber.unioeste.br/index.php/fazciencia/article/view/22105>. Acesso em 04 de março de 2021.

MOURA, O. S.; et al. **Herbário COOE: importância como ferramenta de estudo e conservação da biodiversidade vegetal de Rondônia.** Revista EDUCAmazônia, vol. XIII, n. 1, p. 183-199, 2021. Disponível em: < **https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7797979**>. Acesso em 28 de março de 2021.

NASCIMENTO, C. B. **Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de macroalgas marinhas e sua aplicação no controle de contaminantes do pescado.** 65 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Instituto Federal do Espírito Santo, campus Piúma, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ifes.edu.br/bitstream/handle/123456789/594/TCC_Avalia%c3%a7%c3%a3o_Do_Potencial_Antimicrobiano_De_Extratos_De_Macroalgas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso 19 de março de 2021.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. **Dichloromethane**. PubChem Compound Summary for CID 6344, 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dichloromethane#section=Solubility>. Acesso em 04 de março de 2021.

NERYS, L. C. R. **Potencial citotóxico e antimicrobiano de bioativos de *Syzygium cumini*, *Syzigium malacceense* e *Psidium guineese*.** 61 f. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, 2018. Disponível em: <https://attena.ufpe.br/bitstream/123456789/33078/1/DISSERTA%c3%87%c3%83O%20Leylianne%20de%20C%c3%a1ssia%20Rodrigues%20Nerys.pdf>. Acesso 19 de março de 2021.

PALSIKOWSKI, P. A. **Avaliação de métodos de extração de compostos bioativos das folhas de Pata de vaca (*Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*).** 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2020. Disponível em: <http://131.255.84.103/bitstream/tede/4880/2/Paula_Palsikowski_2020.pdf>. Acesso em 02 de março de 2021.

PAULINO, R. R. **Cromatografia Líquida, Avanços e Inovações**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, 2020. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/93060/1/cromatografia%20FINAL.pdf>. Acesso em 19 de março de 2021.

PEDROZO, L. F. A. **Aprimoramento de protótipo para estudo da higroscopia da madeira com IoT**. 82 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Internet das Coisas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: < http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/13879/1/CT_CEIOT_I_2018_10.pdf>. Acesso em 04 de abril de 2021.

PENHA, I. C. S., et al. **Microbiologia do gelo utilizado na conservação do pescado em um mercado municipal de Belém, PA. Brazilian Journal of Development,** vol. 6, nº 9, p. 66713 - 66724, 2020. Disponível em:

<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/16371/13389>. Acesso em 02 de fevereiro de 2021.

PEREIRA, E. S.; et al. Encontro de pós-graduação, XIX, Semana integrada, 3ª, 2017, Pelotas. **Anais** [...]. Universidade Federal de Pelotas, 2017. 4 p. Tema: Potencial antibacteriano do araçá vermelho (*Psidium cattleianum* L.). Disponível em: < http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2017/CA_03072.pdf>. Acesso em 04 de março de 2021.

PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. **Fisiologia Vegetal.** Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria, 81 p., 2015. Disponível em: <https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/342/2020/04/FISIOLOGIA-VEGETAL.pdf>. Acesso em 28 de março de 2021.

PINHO, L.; et.al. **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcóolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi.** Ciência Rural, v.42, n.2, p.326-331, 2012. Disponível em:< https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000200022>. Acesso em 03 de março de 2020.

PIRES, R. C.; REZZADORI, C. B. D. B. **Uma experiência de produção de videoaula experimental em aulas de Química**. Revista Brasileira de Educação em Ciências e Educação Matemática, v. 3, n. 1, p. 92-108, 2019. Disponível em: <http://e-revista.unioeste.br/index.php/rebecem/article/view/22069>. Acesso em: 29 mar. 2021.

QUEIROZ, M. V. F. **Correlação linear e regressão linear simples no conteúdo de matemática do ensino médio**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Matemática) - Universidade Federal de Campina Grande, 2020. Disponível em: <http://mat.ufcg.edu.br/profmat/wp-content/uploads/sites/5/2020/06/TCC-PROFMAT_MATHEUS_QUEIROZ.pdf>. Acesso em 19 de março de 2021.

REIS, E. K. dos. **Atividade antioxidante de extratos das folhas da *Psidium myrtoides* O. Berg**. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em:< https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/29375>. Acesso em 09 de julho de 2020.

RIZZINI, C. T. **Sistematização terminológica da folha**. Rodriguésia, vol. 29, n. 42, p. 103–125, 1977. Disponível em: <www.jstor.org/stable/23492622>. Acesso em 29 de março de 2021.

ROSA, P. V. S.; et al. **Atividade bactericida do óleo essencial e extrato hidroalcoólico das folhas de *Eucalyptus globulus*.** Research, Society and Development, v. 9, n. 7, e 804974843, 2020. Disponível em: < https://www.rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/4843/4226>. Acesso em 05 de março de 2021.

ROSSETTO, J. A.; SIGNOR, A. **Inovações tecnológicas empregadas em coprodutos gerados pelo processamento do pescado.** PUBVET, v. 15, n. 04, a 796, p. 1-11, 2021. Disponível em: < http://www.pubvet.com.br/artigo/7735/inovaccedilotildees-tecnoloacutegicas-empregadas-em-coprodutos-gerados-pelo-processamento-do-pescado>. Acesso em 28 de março de 2021.

ROTTA, E. H.; et al*.* **Avaliação da extração de óleo de soja com etanol.** Revista de estudos ambientais (Online), v.19, n. 1, p.27-35, 2017. Disponível em: <https://bu.furb.br/ojs/index.php/rea/article/view/6491/3701>. Acesso em 02 de março de 2021.

SAMPAIO, B., EDRADA-EBEL, R. & DA COSTA, F. **Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants.** Sci. Rep., v. 6**,** n. 29265, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep29265.pdf>. Acesso em 29 de março de 2021.

SANTIAGO, M. C. P. A.; et al. **Análise e caracterização de taninos condensados por cromatografia líquida. Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61446-61462, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/15514/12765>. Acesso em 29 de março de 2021.

SANTOS, A. S. **Avaliação das atividades antibacterianas e antifúngicas e triagem fitoquímica de extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais coletadas no**

bioma caatinga. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias em Saúde) - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, 2018.

SANTOS, P. R.; et al. **Qualidade físico-química e microbiológica de pescado congelado consumido na merenda escolar do estado do Amazonas.** Revista PUBVET v.12, n.5, art. 93, p.1-6, 2018. Disponível em:< https://www.pubvet.com.br/artigo/4707/qualidade-fiacutesico-quiacutemica-e-microbioloacutegica-de-pescado-congelado-consumido-na-merenda-escolar-do-estado-do-amazonas#:~:text=to%20WhatsApp%20WhatsApp-,Qualidade%20f%C3%ADsico%2Dqu%C3%ADmica%20e%20microbiol%C3%B3gica%20de%20pescado%20congelado%20consumido%20na,escolar%20do%20estado%20do%20Amazonas&text=O%20presente%20trabalho%20avaliou%20a,rede%20p%C3%BAblica%20estadual%20de%20ensino.>. Acesso em 08 de julho de 2020.

SANTOS, P. R.; VASCONCELOS, E. L. Q.; SOUZA, A. F. L.; JÚNIOR, J. L. S.; INHAMUNS, A. J. **Qualidade físico-química e microbiológica de pescado congelado consumido na merenda escolar do estado do Amazonas**. Revista PUBVET: Medicina Veterinária e Zootecnia, Paraná, v.12, n.5, art. 93, p.1-6, 2018. Disponível em:<https://www.pubvet.com.br/uploads/76504ad0a683953715a55e427d78d018.pdf>. Acesso em 27 de junho de 2020.

SCHULTZ, A.M.B.; FERRONATO, C. POLONI, C.A.; PRIAMO, W.L.; PIETA, L. Simpósio de segurança alimentar, 7º, 2020, *on line*. **Anais** [...]. SBCTA – RS, 2020. 6 p. Tema: Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de *Physalis* frente a patógenos alimentares. Disponível em: < http://schenautomacao.com.br/ssa7/envio/files/trabalho3_263.pdf>. Acesso em 04 de março de 2021.

SENIGALIA, R. L.C.; et al*.* **Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. Braz. J. of Develop**., v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020. Disponível em: < https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/14570/12086>. Acesso em 04 de março de 2021.

SHUKLA, S.; PARK, J.; PARK, J. H.; LEE, J. S.; KIM, M. **Development of novel *Meju* starter culture using plant extracts with reduced *Bacillus cereus* counts and enhanced functional properties.** Scientific Reports, v. 7, n. 11409, p. 1- 13, 2017.

Disponível em: < https://www.nature.com/articles/s41598-017-09551-0.pdf>. Acesso em 03 de março de 2021.

SILVA, A. T. F.; et al. **Alterações microbianas dos produtos de pescado curados: Revisão.** Revista PUBVET, v. 11, n. 7, p. 646-743, 2017. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/3994/alteraccedilotildees-microbianas-dos-produtos-de-pescados-curados-revisatildeo>. Acesso em 17 de julho de 2020.

SILVA, A. N. F.; et al. **Exsicatas como recurso didático: contribuições para o ensino de botânica. Braz. J. of Develop**., v. 6, n. 5, p.24632 - 24639, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/9574/8056>. Acesso 19 de março de 2021.

SILVA, E. B. **Antimicrobianos**. *In*: LACERDA, M. V. G. de; MOURÃO, M. P. G.; TAVARES, A. M. (Org.). Manual de Rotinas da Fundação Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, 2003, v., p. 37-46. Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/manual/>. Acesso em 19 de março de 2021.

SILVA, L. R. da; CUNHA JUNIOR, P. C. da; DUARTE, A. S.; SILVA, M. T. de C.; BARBOSA, M. I. M. J.; MORAIS, L. A. S. de**. Avaliação físico-química e bioativa dos frutos de araçá-roxo (*Psidium myrtoides* O. Berg)**. Simpósio De Engenharia De Alimentos, ed. 3, p. 115-120, 2019, Montes Claros. Interdisciplinaridade e inovação na Engenharia de Alimentos: resumos. Montes Claros: UFMG, 2019. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/207209/1/Avaliacao-fisico-quimica-e-bioativa-dos-frutos-de-araca-roxo.pdf>.

SILVA, R. R. M.; PIRES, C. R. F.; ALMEIDA, H. C. DE A.; SOUSA, D. N. de; SANTOS, V. F. **Pescado na alimentação escolar: caracterização nutricional**. Revista Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, v. 24, n. 2, p. 169-179, jul./dez. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1083396/pescado-na-alimentacao-escolar-caracterizacao-nutricional#:~:text=Pescado%20na%20alimenta%C3%A7%C3%A3o%20escolar%3A%20caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20nutricional.,-Autoria%3A%20SILVA%2C%20R.%20R.%20M.&text=Pensando%20nisso%2C%20avaliou%2Dse%20a,tabelas%20de%20composi%C3%A7%C3%A3o%20de%20alimentos.>. Acesso em 27 de junho de 2020.

Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/341812#>. Acesso em 18 de março de 2018.

SOUSA, I. J. O.; et al. **A Diversidade Da Flora Brasileira No Desenvolvimento De Recursos De Saúde**. Revista Uningá Review, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2017. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/2048>. Acesso em 26 junho de 2020.

SOUSA, L. L. **Marcadores Moleculares Para Caracterização Genética E Genômica Em Espécies De *Psidium***. 114 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal Do Espírito Santo, Alegre, 2019.

SOUZA, M. M. M.; et al. **Avaliação do frescor do pescado congelado comercializado no mercado municipal de São Francisco do Conde - BA**. Boletim do Instituto da Pesca, São Paulo, v. 39, nº 4, p. 359 – 368, 2013. Disponível em:< https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/boletim-do-instituto-de-pesca/39-(2013)-4/avaliacao-do-frescor-do-pescado-congelado-comercializado-no-mercado-mu/>. Acesso em 25 de julho de 2020.

SPRENGER, L. K.; GIESE, E. G., SANTOS, J. N., MOLENTO, M. B. **Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcóolico de *Ficus carica* e *Polygala spectabilis.*** Archives of Veterinary Science, v.22, n.3, p.01-07, 2017. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/43464/34109>. Acesso em 03 de março de 2021.

TARCITANO, L. A. C.; MESQUITA, E. de F. M. de. **Ação dos condimentos alimentares *in natura* sobre a microbiota patógena durante o processamento, preparo e/ou consumo do pescado: uma revisão sistemática de literatura**. Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza, v. 50, n. 1, p. 141-162, 2017. Disponível em: < http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/26097>. Acesso em 28 de março de 2021.

THIPPESWAMY, S.; et al. **Evaluation of some pharmacological activities of Budmunchiamine - A isolated from *Albizia amara*. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 139-143, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000100139&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 09 de julho de 2020.

TRINDADE, J. K. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de variedades de *Psidium guajava***. 50 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química Industrial) - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2019. Disponível em: <http://riu.ufam.edu.br/bitstream/prefix/5732/9/TCC_Jana%c3%adnaTrindade.pdf>. Acesso em 02 de março de 2021.

TULER, A. C.; CARRIJO, T. T.; PEIXOTO, A. L.; et al. **Diversification and geographical distribution of *Psidium* (Myrtaceae) species with distinct ploidy levels**. Trees, v. 33, p. 1101–1110, 2019. Disponível em:< https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00468-019-01845-2.pdf>. Acesso em 12 de julho de 2020.

TULER, A. C.; et al. **Flora of Espírito Santo: *Psidium* (Myrtaceae)**. Rodriguésia, v. 68, n. 5, p. 1791-1805, 2017. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602017000701791&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 de março de 2020.

VASCONCELOS L. C.; SANTOS E. S.; BERNARDES C. O.; et al. **Phytochemical analysis and effect of the essential oil of *Psidium* L. species on the initial development and mitotic activity of plants**. Environmental science and pollution research international. v. 26, n. 25, p. 26216-26228, 2019. Disponível em: < https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-019-05912-6>. Acesso em 09 de julho de 2020.

VEIGA, A. **Padronização e validação do método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, 2016. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/43389/R%20-%20D%20-%20ANDRESSA%20VEIGA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 19 de março de 2021.

VEIGA FILHO, I. L.; MESQUITA, E. F. M. **Aminas biogênicas em pescado: ocorrência, relevância e detecção.** Revista Semioses: Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade, v.12, n. 3, p. 115-141, 2018. Disponível

em:<https://revistas.unisuam.edu.br/index.php/semioses/article/view/119>. Acesso em 25 de julho de 2020.

VENCATO. A. A.; et al. **Salt and crude plant extracts as preservatives in a meat model system (ground pork shoulder).** Rev. Caatinga, v. 33, n. 2, p. 562 – 570, 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/8823/10225>. Acesso em 28 de março de 2021.

VERAS, F. E. L., Fé, F. de S. M., NUNES, I. da S. G., COSTA, I. M., MOURA, W. C., & MARQUES, R. B**. Intoxicação com aditivos alimentares**, Revinter, vol. 14, n. 1, p. 5 -10, 2021. Disponível em:<https://doi.org/10.22280/revintervol14ed1.413>. Acesso em 28 de março de 2021.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S.; SILVEIRA, S. M. **Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas.** Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, v. 4, n. 1, p. 111 – 124, 2018. Disponível em: <https://revistas.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/13312/9628>. Acesso em 27 de janeiro de 2021.

VIANA, K. R. **Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato de folhas de araçaúna na conservação do pescado.** 55 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Pesca) – Instituto Federal do Espírito Santo, Piúma, 2019.

VICENTE, E. O. **Atividade antimicrobiana de extratos de folhas, caules e raízes de *Eugenia klotzschiana* O. Berg (Myrtaceae).** 78 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/13807/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20de%20mestrado.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 02 de março de 2021.

WIGGERS, I; STANGE, C. E. B. **Manual de instruções para coleta, identificação e herborização de material botânico**. UNICENTRO, 45 f., Laranjeiras do Sul, 2008. Disponível em: <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/733-2.pdf>. Acesso em 28 de março de 2021.

YANG L, WEN K-S, RUAN X, ZHAO Y-X, WEI F, WANG Q. **Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors**. Molecules, vol. 23, n. 4, p. 762, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/762/htm>. Acesso em 29 de março de 2021.