



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SUSAN GABRIELLY PEREIRA MEDEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE EM
DIFERENTES PARTES DO TRAPIÁ (*CRATAEVA TAPIA* L.), PROVENIENTES DO
SEMIÁRIDO CEARENSE**

FORTALEZA

2022

SUSAN GABRIELLY PEREIRA MEDEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE EM
DIFERENTES PARTES DO TRAPIÁ (*CRATAEVA TAPIA* L.), PROVENIENTES DO
SEMIÁRIDO CEARENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof^ª. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva.

Coorientador: Fernando Eugênio Teixeira Cunha.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M437a Medeiro, Susan Gabrielly Pereira.
Avaliação do potencial antimicrobiano e toxicidade em diferentes partes do Trapiá (*Crataeva tapia* L.),
provenientes do semiárido cearense / Susan Gabrielly Pereira Medeiro. – 2022.
47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Alimentos, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Fernando Eugênio Teixeira Cunha.

1. *Crataeva tapia* L.. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Toxicidade. 4. *Artemia salina*. I. Título.
CDD 664

SUSAN GABRIELLY PEREIRA MEDEIRO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE EM DIFERENTES
PARTES DO TRAPIÁ (*CRATAEVA TAPIA* L.), PROVENIENTES DO SEMIÁRIDO
CEARENSE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Engenharia de Alimentos do
Departamento de Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Engenheiro de
Alimentos.

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Fernando Eugênio Teixeira Cunha (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Neuma Maria de Souza Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

MSc. Kellen Mirando Sá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha mãe, Antonia.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e minha tia Fátima por sempre me incentivarem e me apoiarem em todos os momentos, me fazendo acreditar que tudo é possível. Nada seria possível sem os seus conselhos e ensinamentos.

Ao meu namorado, André por acreditar em mim e sempre me incentivar a continuar, mesmo nos momentos mais difíceis.

À Instituição Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de aprendizado e por todo o conhecimento adquirido.

A Prof^a. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva, pela excelente orientação, paciência, disponibilidade e por me conceder a oportunidade de atuar como monitora da disciplina de Microbiologia de Alimentos.

Ao mestrando Fernando Eugênio Teixeira Cunha, por me auxiliar nas dúvidas e questionamentos durante essa jornada e por coorientar o presente trabalho.

As participantes da banca examinadora Dra. Neuma Maria de Souza Pinheiro e MSc. Kellen Mirando Sá pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos mestrandos Izabel e Yago do Laboratório de Cereais e à técnica Neuma do Laboratório Didático de Microbiologia de Alimentos por se disporem a auxiliar e ensinar as metodologias de pesquisa.

Aos meus colegas, especialmente, Thayná, Vitória e Giulia que fizeram parte da minha trajetória na UFC e que me estimularam e encorajaram durante o período da graduação.

“Os sonhos não determinam o lugar que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.” (Augusto Cury).

RESUMO

As plantas, desde os primórdios da humanidade, são utilizadas e aplicadas em diversas práticas fitoterápicas. Elas são conhecidas principalmente por seus efeitos naturais conservativos, sendo também utilizadas na indústria alimentícia, com destaques na alimentação natural e saudável. Baseando-se nessas práticas e em recentes estudos realizados com plantas e suas substâncias, a espécie vegetal *Crataeva tapia* L. (Trapiá), é encontrada na região do semiárido, pertencente à família *Capparaceae* e surge como uma fonte de compostos que possuem propriedades bioativas, antioxidantes e antimicrobianas. Buscando promover sua possível aplicação como um coadjuvante na conservação de produtos na indústria de alimentos, o presente trabalho objetivou analisar extratos aquosos obtidos por meio das técnicas extrativas de maceração, turbolização e assistida por ultrassom, a partir de diferentes partes do Trapiá (folhas, flores e pecíolo), com foco nas suas propriedades antimicrobianas e sua toxicidade. Cada parte do Trapiá foi selecionada, pesada, higienizada, desidratada e submetida à extração aquosa, sendo realizados bioensaios de letalidade aguda frente à *Artemia salina*, seguido da difusão em ágar por poços para determinação da atividade antimicrobiana. Como resultado para os testes de toxicidade, foi evidenciada atoxicidade ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) para a maioria dos extratos (FOTM, FOTT, FOTU, FTT, PTT, PTM e PTU). Para a análise antimicrobiana, apenas o extrato PTM apresentou halo de inibição de 9 mm para a concentração de 100 mg/mL, demonstrando atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, em contrapartida, não apresentou nenhum efeito sobre *Salmonella Enteritidis*. Logo, pode-se observar ausência de toxicidade para a concentração analisada dos extratos de *C. tapia* frente à *Artemia salina* e atividade antimicrobiana, apenas para um dos extratos, estando em sua concentração máxima testada. Sugere-se, a realização de novas pesquisas, visando o emprego de temperaturas de secagem mais brandas, técnicas extrativas diversas, aplicação de métodos de concentração, utilização de solventes apolares e por fim a utilização de extratos em base seca, visando o aumento da concentração das substâncias bioativas presentes nos extratos. Desta forma a potencialidade de uso da *Crataeva tapia* L. será mais evidenciada e sua aplicação em produtos da indústria alimentícia poderá ser considerada.

Palavras-chave: *Crataeva tapia* L., atividade antimicrobiana, toxicidade, *Artemia salina*.

ABSTRACT

Plants, since the dawn of humanity, are used and applied in various herbal practices. They are mainly known for their natural conservative effects, and are also used in the food industry, with emphasis on natural and healthy food. Based on these practices and on recent studies carried out with plants and their substances, the plant species *Crataeva tapia* L. (Trapiá), is found in the semi-arid region, belonging to the *Capparaceae* family and appears as a source of compounds that have bioactive properties, antioxidants and antimicrobials. Seeking to promote its possible application as a coadjuvant in the conservation of products in the food industry, the present work aimed to analyze aqueous extracts obtained through maceration, turbolization and ultrasound-assisted extractive techniques, from different parts of Trapiá (leaves, flowers and petiole), focusing on their antimicrobial properties and their toxicity. Each part of Trapiá was selected, weighed, sanitized, dehydrated and subjected to aqueous extraction, with acute lethality bioassays being performed against *Artemia salina*, followed by agar diffusion through wells to determine antimicrobial activity. As a result of the toxicity tests, non-toxicity ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) was evidenced for most extracts (FOTM, FOTT, FOTU, FTT, PTT, PTM and PTU). For the antimicrobial analysis, only the PTM extract showed an inhibition halo of 9 mm for the concentration of 100 mg/mL, demonstrating antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, on the other hand, it did not show any effect on *Salmonella Enteritidis*. Therefore, it can be observed absence of toxicity for the analyzed concentration of the extracts of *C. tapia* against *Artemia salina* and antimicrobial activity, only for one of the extracts, being in its maximum concentration tested. It is suggested that new research be carried out, aiming at the use of milder drying temperatures, different extractive techniques, application of concentration methods, use of non-polar solvents and finally the use of extracts on a dry basis, aiming at increasing the concentration of the bioactive substances present in the extracts. In this way, the potential use of *Crataeva tapia* L. will be more evident and its application in food industry products can be considered.

Keywords: *Crataeva tapia* L, antimicrobial activity, toxicity, *Artemia salina*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Forma trifoliolada das folhas e pecíolo da <i>Crataeva tapia</i> L.	18
Figura 2 – Detalhes das flores da <i>Crataeva tapia</i> L..	18
Figura 3 – Determinação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar	21
Figura 4 – Ciclo de vida da <i>Artemia salina</i>	24
Figura 5 – Processamento primário e secagem dos materiais vegetais	26
Figura 6 – Fluxograma do processo de extração dos compostos bioativos	27
Figura 7 – Esquema de preparação e execução do teste de toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i>	30

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação utilizada para cálculo do rendimento dos materiais vegetais após secagem	27
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações de <i>Artemia salina</i> em bioensaios como modelo de avaliação de toxicidade de extratos vegetais	25
Tabela 2 – Quantidades de reagentes utilizados para o preparo de 1L de solução de água salina	29
Tabela 3 – Rendimento do material após processo de secagem	32
Tabela 4 – Resultados do teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	32
Tabela 5 – Atividade antimicrobiana dos extratos das folhas, flores e pecíolos do Trapiá (<i>Crataeva tapia</i> L.)	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
C	Celsius
CL ₅₀	Concentração letal média 50%
Cm	Centímetro
CIM	Concentração inibitória mínima
DL ₅₀	Dose letal média 50%
DTA's	Doenças transmitidas por alimentos
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FABBE	Fábrica de aparelhos bacteriológicos biológicos e esterilizadores
FOT	Folha do Trapiá
FOTM	Extrato aquoso das folhas do Trapiá pelo método de maceração
FOTT	Extrato aquoso folhas do Trapiá pelo método de turbolização
FOTU	Extrato aquoso das folhas do Trapiá pelo método de ultrassom
FT	Flor do Trapiá
FTM	Extrato aquoso das flores do Trapiá pelo método de maceração
FTT	Extrato aquoso das flores do Trapiá pelo método de turbolização
FTU	Extrato aquoso das flores do Trapiá pelo método de ultrassom
g	Gramas
G-	Gram negativas
G+	Gram positivas
h	Hora
Hz	Hertz
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standard</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Peso inicial do material vegetal

ppm	Parte por milhão
P _s	Peso do material vegetal seco
PT	Pecíolo do Trapiá
PTM	Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de maceração
PTT	Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de turbolização
PTU	Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de ultrassom
R _t	Rendimento total do material vegetal
TSA	<i>Agar Tryptic Soy</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC	Unidade formadora de colônias
W	Watts
µg	Microgramas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
/	Barra
°	Graus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	A importância da investigação da potencialidade antimicrobiana de vegetais	16
3.2	<i>Crataeva tapia</i> L.	17
3.2.1	<i>Descrição botânica</i>	18
3.2.2	<i>Propriedade bioativas</i>	19
3.3	Atividade antimicrobiana	19
3.3.1	<i>Definição</i>	19
3.3.2	<i>Tipos de antimicrobianos</i>	20
3.3.3	<i>Importância do uso de antimicrobianos em alimentos</i>	20
3.3.4	<i>Teste de difusão em ágar (Técnica do poço)</i>	21
3.3.5	<i>Salmonella Enteritidis</i>	22
3.3.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.4	Investigação da toxicidade em novos aditivos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Material vegetal	26
4.2	Rendimento do material vegetal	27
4.3	Obtenção dos extratos vegetais brutos	27
4.3.1	<i>Extração por maceração</i>	28
4.3.2	<i>Extração por turbulização</i>	28
4.3.3	<i>Extração assistida por ultrassom</i>	28
4.4	Bioensaio de letalidade frente à <i>Artemia salina</i>	29
4.5	Determinação da atividade antimicrobiana	30
4.5.1	<i>Ativação das cepas de bactérias</i>	30
4.5.2	<i>Método de difusão em ágar por poços</i>	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	Rendimento do material vegetal	31

5.2	Bioensaio de letalidade frente à <i>Artemia salina</i>	32
5.3	Método de difusão em ágar por poços	34
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O Ceará compreende, aproximadamente, 14,9 milhões de hectares de extensão, dos quais 8,5 milhões são de áreas florestais, equivalente a uma média de 57% de sua área total. Reconhecido pelo clima predominantemente semiárido, o Estado apresenta altas temperaturas e uma vegetação caracterizada pelo bioma caatinga, típico do sertão nordestino (BRASIL, 2016). A caatinga, como sua principal cobertura vegetal, representa uma média de 46% e a diversidade de sua flora apresenta, como característica arbórea principal, árvores altas com caules retilíneos e um sub-bosque de espécies menores como arbustos (MAIA *et al.*, 2018).

As plantas, desde os primórdios da humanidade, são utilizadas e aplicadas em práticas fitoterápicas. Tais práticas envolvem métodos extrativos de componentes simples ou compostos a fim de se obter efeitos biológicos diversos e adversos, desejáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Dentre tais efeitos, destacam-se as atividades antioxidantes, antibacterianas, antivirais e a modulação de enzimas de desintoxicação. Há, ainda, compostos ou substâncias que atuam como bioativos, como por exemplo, os ácidos graxos, as fibras, os aminoácidos essenciais e os compostos fenólicos. (COSTA; JORGE, 2011).

Além disso, as plantas e seus extratos vegetais são conhecidos por seus efeitos naturais conservativos, sendo utilizadas na indústria alimentícia, com destaques na alimentação natural e saudável, assim como na indústria farmacêutica (DEL RÉ; JORGE, 2012).

A utilização de compostos, sejam naturais ou sintéticos, em alimentos, é justificada por razões nutricionais e sensoriais, buscando promover vantagens no âmbito industrial e visando, sobretudo, a demanda do consumidor final (SOUZA *et al.*, 2019). Os compostos naturais, ou aditivos naturais, como o próprio termo já evidencia, ocorrem de forma natural, enquanto os sintéticos, são obtidos a partir de reações físico-químicas forçadas e, devido a sua forte estabilidade química, facilidade de obtenção e baixo custo, acabam sendo mais utilizados (PEREIRA *et al.*, 2020).

Ainda referindo-se aos aditivos, há uma tendência da utilização de conservantes antimicrobianos naturais voltada à segurança e à qualidade alimentícia, considerada como alternativa em face a outros sistemas de preservação comumente utilizados, como térmicos ou químicos (RODRIGUES *et al.*, 2021). Ademais, a busca por uma alimentação mais saudável, associada à descoberta da presença de compostos bioativos e de propriedades desejáveis, tornou mais forte a procura pelos aditivos naturais nos últimos anos (PEREIRA *et al.*, 2020).

De acordo com Nogueira *et al.* (2019), cada vez mais, a utilização de conservantes sintéticos vem sendo moderada em função de vários estudos que apresentam os malefícios para a saúde humana provenientes do excessivo uso desse tipo de conservante. Conforme Hess (2018), desde a década de 70 os aditivos alimentares são descritos como causadores de intoxicação em humanos, mesmo quando usados de acordo com as recomendações. A partir disso, tem-se buscado, preferencialmente, por alimentos menos industrializados, elevando-se a procura por conservantes naturais e, destacando assim, a importância do conhecimento sobre as substâncias de origem vegetal.

Baseando-se nessas práticas e em recentes estudos realizados com plantas e suas substâncias, a *Crataeva tapia* L., mais conhecida no Ceará como Trapiá, pertencente à família *Capparaceae* (CORNEJO *et al.*, 2015), destaca-se por apresentar compostos que possuem propriedades bioativas anti-inflamatórias, antitumorais e analgésicas, além de possuir, também, atividade inseticida (ZANG *et al.*, 2013). Além disso, foi observado por Salvat *et al.* (2001) durante seus experimentos, que os extratos metanólicos de *C. tapia* apresentam significativa atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, e que tal propriedade está diretamente relacionada com a presença de seus compostos bioativos.

O presente trabalho objetivou a análise de extratos aquosos obtidos por meio das técnicas de maceração, turbolização e assistida por ultrassom, de diferentes partes do Trapiá (folhas, flores e pecíolo), avaliando, assim, suas propriedades antimicrobianas e sua toxicidade, a fim de promover sua possível aplicação como um coadjuvante na conservação de produtos na indústria de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar, sob a óptica antimicrobiana e toxicológica, extratos aquosos do Trapiá (*C. tapia* L.) provenientes das folhas, flores e pecíolos, com foco na conservação de alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o processamento primário das partes vegetais e submeter à secagem;
- Obter diferentes extratos a partir das folhas, flores e pecíolos desidratados do Trapiá pelas técnicas de maceração, turbolização e assistida por ultrassom;
- Determinar o potencial de atividade antimicrobiana;
- Avaliar seu potencial toxicológico frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A importância da investigação da potencialidade antimicrobiana de vegetais

Ao longo da história humana, a utilização de plantas medicinais fez-se presente de várias maneiras como sendo um dos primeiros métodos terapêuticos difundidos pelos povos ancestrais para o tratamento de doenças que assolavam a população naquela época (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Nas últimas décadas, a pesquisa científica na área de produtos naturais, vem comprovando a ação farmacológica de diversos compostos botânicos, com destaque para a área da microbiologia, cujo foco são substâncias com ação contra bactérias resistentes aos antimicrobianos sintéticos. Destacam-se plantas como o Alecrim pimenta (*Lippia origanoides*) cujo óleo essencial, rico em Timol, tem ação contra diversos microrganismos, de acordo com Matos (2007).

O metabolismo secundário condiciona o mecanismo de defesa dos vegetais a produzirem substâncias que vêm a ser utilizadas contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros, possuindo, também, importância nutricional e farmacológica para os seres vivos (BORGES; AMORIM, 2020). Tais substâncias podem apresentar características

antimicrobianas e/ou bactericidas, além de atuar como antibióticos, recebendo, ainda, a denominação de fitocidas ou preparados semelhantes a antibióticos (GONÇALVES; FILHO; MENEZES, 2005).

Nesse contexto, destacam-se partes diversas da estrutura dos vegetais, como as folhas, as raízes, a casca, a polpa e as sementes, evidenciadas em recentes estudos por possuírem maior potencialidade de extração dos compostos bioativos presentes em suas matrizes. Tratando-se da sua aplicabilidade na indústria de alimentos, essas espécies vegetais tornam-se fortes alternativas para substituição dos compostos tradicionalmente utilizados, os aditivos sintéticos, por seus vínculos com uma alimentação mais saudável, além de apresentarem atividades antioxidantes, antimicrobianas e digestivas, utilizadas no prolongamento da vida de prateleira (*Shelf life*) dos alimentos (ALVARENGA, 2018; RIZZO *et al.*, 2010; KAMEL, 2000).

Além disso, estudos recentes comprovam que a adição de extratos vegetais em produtos alimentícios processados se mostra como oportunidade de promoção, bem como incentivo, para a ingestão de ingredientes funcionais sem gerar qualquer relativa mudança nos hábitos alimentares da população. Um exemplo de sucesso, que demonstra os benefícios da utilização de antimicrobianos naturais, sobretudo, os derivados de extratos vegetais, é a presença de isotiocianatos nos compostos da mostarda, que além de conferir atividade antimicrobiana, apresenta ainda potencial quimiopreventivo (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

De acordo com Savia (2021), a potencial presença de microrganismos patogênicos nos alimentos representa uma séria ameaça à segurança alimentar, resultando numa maior resistência antimicrobiana. Essa resistência apresenta um aumento ainda maior, quando as substâncias antibióticas, normalmente consumidas, são utilizadas de forma abusiva ou inadequada (PARREIRA *et al.*, 2020).

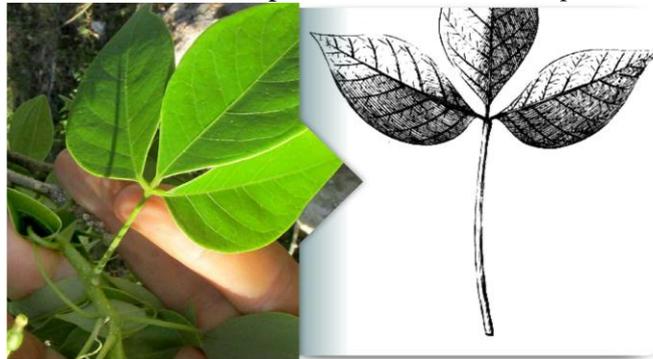
Diante do exposto, é de suma importância à realização de pesquisas em busca de novas alternativas para a melhoria da conservação dos alimentos, em específico as substâncias de origem vegetal. Por meio dessas novas pesquisas, será possível identificar, de forma mais precisa, em meio à grande diversidade de antimicrobianos, o que se classifica como mais ideal, visando substâncias com espectro de ação maximizado e toxicidade reduzida, e apresentando, ainda, grande ação sobre a sensibilidade de microrganismos patogênicos (PARREIRA *et al.*, 2020).

3.2 *Crataeva tapia* L.

3.2.1 Descrição botânica

A *Crataeva tapia* L., também conhecida como pau d’alho, cabeceira, cabaceira e cabaceira-do-pantanal, é popularmente conhecida no Ceará como Trapiá (SOUSA, 2019). Pertencente à família *Capparidaceae*, é uma planta que apresenta copa arredondada e densa, chegando a uma média de altura entre 5 e 12 m. Seu tronco, geralmente tortuoso, possui forma ligeiramente cilíndrica, com casca áspera e acastanhada (LIMA, 2012), variando seu diâmetro entre 20 e 40 cm. Suas folhas, com pecíolo comum, variando de 4 a 12 cm de comprimento, são basicamente dispostas de forma trifolioladas (Figura 1), com folíolos membranáceos e glabros nas duas faces (LORENZI, 2008).

Figura 1 - Forma trifoliolada das folhas e pecíolo da *Crataeva tapia* L.



Fonte: elaborado pela autora.

As flores desta espécie são brancas, distribuídas em cachos, com uma base comprida e pétalas unguiculadas (NETO; LUBER, 2020) (Figura 2). Seus frutos apresentam baga globosa, além de polpa bastante carnosa, com um número alto de sementes. Por se tratar de uma planta decídua, heliófila, além de ser seletiva higrófila, ocorre de forma preferencial em formações secundárias de várzeas úmidas, com solos um tanto salinos (LORENZI, 2008).

Figura 2 - Detalhes das flores da *Crataeva tapia* L.



Fonte: elaborado pela autora.

3.2.2 Propriedades bioativas

Segundo Azevedo *et al.* (2015), a espécie *C. tapia* apresenta, dentre seus principais componentes, os flavonoides, que atuam inibindo a formação dos radicais livres, tornando esse vegetal uma potencial fonte de compostos antioxidantes. Ainda, segundo Arruda (2021), os frutos, as cascas e as folhas dessa espécie apresentam propriedades benéficas associadas à existência de compostos bioativos em sua composição.

De acordo com alguns estudos, essa mesma casca possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antitumorais, além de possuir atividades inseticidas (ZHANG *et al.*, 2013). Conforme Sharma, Patil e Patil (2013) suas folhas e frutos também são utilizados no combate às infecções do trato respiratório, no tratamento estomáquico e antidisentérico, assim como no febrífugo. Além disso, os extratos de suas folhas apresentam acentuada atividade alelopática podendo atuar como herbicida natural, para o desenvolvimento de substâncias antibacterianas.

3.3 Atividade antimicrobiana

3.3.1 Definição

Os antimicrobianos são conhecidos por serem substâncias químicas que atuam inibindo o crescimento (microbiostático) ou causando a morte dos microrganismos (microbiocida) (TIMENETSKY, 2017). Tais substâncias podem ser denominadas como antibacterianos, antifúngicos ou antivirais, dependendo de seu espectro de ação. Seu mecanismo de atuação é baseado na inibição da duplicação do material genético, impedindo a síntese das proteínas e modificando assim a permeabilidade da membrana plasmática ou ainda interferindo nas rotas metabólicas dos microrganismos, dessa forma, neutralizando seu metabolismo ou induzindo a sua morte (CARNEIRO; BADARI, 2022).

De acordo com Silva (2003), dois conceitos principais precisam ser considerados, durante a utilização de antimicrobianos: o espectro de ação e a potência (associada à CIM - Concentração Inibitória Mínima). O espectro de ação refere-se à porcentagem de espécies sensíveis a ação de um determinado composto antimicrobiano, enquanto a potência é entendida como a concentração necessária para a inibição do crescimento bacteriano.

Além disso, segundo Campos (2014), existem características essenciais para que um agente antimicrobiano seja considerado ideal. Dentre elas, possuir toxicidade seletiva, ou seja, ser capaz de eliminar o patógeno sem prejudicar o hospedeiro, não incitar qualquer resistência bacteriana, chegar a níveis bactericidas no organismo por grandes períodos, além de não apresentar condição alergênica e ter condições de atingir o sítio infeccioso. Por fim, ainda precisa demonstrar espectro de ação suficientemente satisfatório (G+ e G-).

É importante ressaltar, ainda, que a preferência por um composto antimicrobiano deve se basear, sobretudo, em sua afinidade química e sensorial com certo tipo de alimento, além de conferir sua eficiência contra microrganismos indesejáveis e sua segurança atribuída (BARROS *et al.*, 2020).

3.3.2 Tipos de antimicrobianos

De acordo com Melo, Duarte e Soares (2012), há duas classificações para antimicrobianos: sintéticos ou naturais. Os produzidos em massa por indústrias químicas e farmacêuticas são os considerados sintéticos, enquanto os naturais são resultado do metabolismo de animais, vegetais ou de outros microrganismos (CARNEIRO; BADARI, 2022).

Dentre os dois, os antimicrobianos naturais vêm ganhando notoriedade como excelente alternativa quando se fala de produtos mais seguros. Além de apresentarem ótima qualidade, ainda contribuem para o aumento significativo na vida de prateleira de alimentos perecíveis, por exemplo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010; BARROS *et al.*, 2020).

3.3.3 Importância do uso de antimicrobianos em alimentos

Nos dias atuais, os antimicrobianos são vastamente utilizados na prevenção e no tratamento de infecções, mas também na conservação dos alimentos. A busca mundial por uma alimentação mais saudável e equilibrada tem destacado, de forma acentuada, os devidos cuidados que devem ser considerados com os alimentos e os produtos capazes de lhes conferir propriedades desejáveis (BONDI *et al.*, 2017).

Os conservantes naturais, são boas alternativas em substituição aos conservantes químicos, uma vez que, possuem a capacidade de melhorar a estabilidade oxidativa, concedem propriedades funcionais aos alimentos, propiciando um produto com maior qualidade, além de estender sua validade com segurança (SILVA; MARQUES; CONSTANT,

2021).

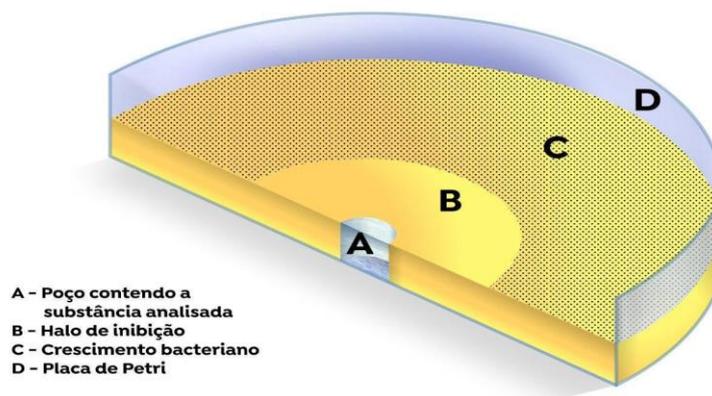
Dessa forma, observa-se que a utilização de conservantes naturais contribui, diretamente, para a redução da degradação e de outros problemas relacionados aos alimentos, além de transmitir maior segurança aos consumidores que buscam uma forma de vida mais saudável. Ademais, por possuírem compostos bioativos, que atuam como agentes responsáveis ou que impulsionam as atividades antimicrobianas e antioxidantes, sua função se destaca como principal biofator de conservação dos alimentos (SHARIF *et al.*, 2017; SILVA; MARQUES; CONSTANT, 2021).

3.3.4 Teste de difusão em ágar (Técnica do poço)

Durante a pesquisa por novos compostos antimicrobianos, alguns testes qualitativos podem ser realizados (SILVA, 2018). Em relação à sensibilidade, a técnica mais utilizada é o teste de difusão em ágar, sendo o método de disco-difusão o mais frequentemente empregado (NCCLS, 2003). Há também autores que apontam o método por difusão em poço como alternativa ao teste de disco-difusão, para averiguação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais (SILVEIRA *et al.*, 2009; BONA *et al.*, 2014; SILVA, 2018).

O teste de difusão em ágar baseia-se na propagação da substância em estudo no meio de cultura em que é inserida, onde, por meio do processo de difusão ocorre o aparecimento de um halo, decorrente da inibição do crescimento microbiano, denominado halo de inibição (NCCLS, 2006) (Figura 3). Esta técnica é considerada uma análise presuntiva amplamente utilizada e vantajosa, uma vez que necessita de pequenos volumes de amostra e possibilita o teste de várias amostras para um mesmo microrganismo (CAVALCANTE, 2011).

Figura 3 - Determinação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar.



Fonte: elaborado pela autora.

O método de difusão em poço consiste na inoculação das placas com o microrganismo de interesse (SILVA; SONEHARA, 2018) seguido da remoção de algumas partes do meio de cultura sólido com o auxílio de cilindros com diâmetros que variam entre 6 e 8 mm, formando poços, onde são feitas as aplicações das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY *et al.*, 2008; BONA *et al.*, 2014). Após o período de incubação os halos são medidos e é então estabelecida a sensibilidade do microrganismo a substância analisada (SOUZA *et al.*, 2003; SILVA; SONEHARA, 2018).

3.3.5 *Salmonella Enteritidis*

Salmonella é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, apresentando estrutura em forma de bacilos, sendo gram negativa, anaeróbia facultativa, com temperatura ideal de crescimento de 37 °C, e faixa de pH entre 4,5 e 9,5. Tais bactérias são capazes de produzir ácidos e gases, a partir de glicose e outros carboidratos, sem que seja necessária a utilização de qualquer tipo de lactose ou sacarose. Para mais, são oxidase negativa e catalase positiva, conseguindo crescer apenas com citrato como fonte de carbono (ANDRADE, 2005; HENTZ; SANTIN, 2009).

Essa bactéria é responsável por infecções alimentares, podendo em casos graves levar ao óbito. Se tratando de gênero, é classificada em duas espécies: *S. enterica* (com 2.610 sorovares) e a *S. bongori* (com 23 sorovares) (MAPA, 2021). No âmbito da saúde pública, segundo Marques (2017), as ocorrências de contaminações alimentares por *Salmonella* constituem uma grande preocupação mundial, levando em consideração a gravidade dos casos.

Em recentes estudos, baseados em levantamentos e notificações, nos Estados Unidos, em 2015, foi confirmado que o agente bacteriano mais isolado em infecções humanas, relacionadas ao consumo de alimentos contaminados, é a *Salmonella* e que dentre os sorovares notificados, o sorovar *Enteritidis* demonstrou maior prevalência entre os casos de contaminação (MARQUES, 2017).

No Brasil, durante o período de 2013 a 2017, o país registrou 123 surtos de Salmonelose, dos quais 8,1% estavam interligados à contaminação por *S. E.* Dentre as regiões mais notificadas estavam, a região Sul com 42 casos e a região Nordeste com 34 casos. O início destes surtos estava diretamente relacionado ao consumo de produtos como ovos/derivados de ovos, alimentos mistos, carne bovina crua e outros alimentos não identificados (CAETANO; PAGANO, 2019).

3.3.6 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus*, segundo Freitas *et al.* (2013), integra à família Micrococcaceae e apresenta-se como uma bactéria gram positiva, de formato esférico, podendo ser tanto aeróbia, como anaeróbia facultativa, sendo identificada na pele de cerca de 15% dos seres humanos. Esse microrganismo povoa a mucosa e pele humanas, corriqueiramente, integrando-se à flora natural de seu hospedeiro, condicionando-o como portador crônico (CORDEIRO, 2011; FEITOSA *et al.*, 2017).

Esta bactéria é responsável por causar uma das DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos) (SILVA *et al.*, 2017) com maior incidência entre a população, tendo sua ocorrência diretamente relacionada com a ingestão de alimentos contaminados com as enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas. No Brasil, 9,5% dos casos de DTAs notificados entre os anos de 2008 a 2019, apresentaram como principal indicador de contaminação, *S. aureus*. Durante o ano de 2019, dos 18 surtos por intoxicação estafilocócica, 8 se deram na região Nordeste, 4 na região Sudeste, 3 na região Norte e 3 na região Sul (OLIVEIRA, 2021).

Enfatiza-se ainda, que, entre os principais fatores que corroboram para o aparecimento de surtos relacionados a este microrganismo, estão a manipulação inadequada de alimentos e o descumprimento dos protocolos de boas práticas de fabricação (FEITOSA, 2017).

3.4 Investigação da toxicidade em novos aditivos

Os aditivos alimentares, sejam eles de origem natural ou artificial, são amplamente empregados desde a conservação até mesmo a saborização de diferentes tipos de alimentos. Atualmente, mais de 2500 aditivos são utilizados de forma a garantir ao alimento alguma característica desejada, entretanto, em decorrência do seu potencial tóxico, alguns tipos de aditivos tiveram sua comercialização/utilização proibida em alguns países (LACERDA, 2017).

Devido ao consumo de alimentos com a presença de aditivos em níveis inadequados ou ainda tóxicos, se faz necessária a realização de diversos testes toxicológicos, com a finalidade de identificação dos efeitos de tais substâncias no organismo e padronização de determinados parâmetros (MOURA *et al.*, 2012).

Os estudos toxicológicos são de grande importância, uma vez que comprovam a segurança de novos aditivos através da identificação de efeitos potenciais adversos e as condições de exposição que produzem esses efeitos (relação dose-resposta). Ademais tais dados são também utilizados como parâmetro para a regulamentação da utilização ou não dessas substâncias (LACERDA, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2019).

Segundo o Conselho Nacional de Saúde, existem cinco tipos de ensaios de toxicidade que podem ser aplicados, sendo eles, toxicidade aguda, subaguda, crônica, embriotoxicidade e teratogenicidade, que são realizados por meio de técnicas *in vitro* e/ou *in vivo* (SPRADA, 2013). Dentre essas, a técnica *in vitro* distingue-se por possibilitar a substituição e redução do uso de animais, em especial, os vertebrados durante o processo de experimentação, por meio da utilização de fungos, algas, bactérias, crustáceos, entre outros organismos (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

A *Artemia salina* L. (Figura 4), é uma espécie primitiva de microcrustáceo pertencente à ordem Anostraca, que se caracteriza por ser muito pequena (10 mm) e viver em ambientes com elevada salinidade (MAIA *et al.*, 2018). Esse microcrustáceo tem a capacidade de produzir cistos, com diâmetro variando de 0,2 a 0,3 mm, e náuplios de 0,45 mm de comprimento e 0,1 mm de largura (GOMES, 2012).

Figura 4 - Ciclo de vida da *Artemia salina*.



Fonte: S.B.T. Investments Holding Ltd (2020).

Sua adaptabilidade a águas que sofrem com grandes variações, combinada com a facilidade de obtenção de seus cistos, tornam a *Artemia* uma ótima opção para a aplicação em testes de toxicidade, envolvendo uma ampla gama de produtos (GOMES, 2012). De forma generalizada, os compostos bioativos contidos nos extratos podem ser tóxicos para as larvas de *Artemia salina* e devido a essa letalidade, o teste com esse microcrustáceo pode ser

utilizado de forma preliminar, como um método rápido, simples e de baixo custo (CAMPOS *et al.*, 2020) para a análise do potencial tóxico de compostos e substâncias isoladas (RAHMAN; CHOUDHARY; THOMSON, 2001; HIROTA *et al.*, 2012; MOREIRA, 2013).

Este ensaio possui grande relevância, tendo em vista que na literatura existem numerosos estudos que relacionam os resultados obtidos de toxicidade com outras atividades, tais como: anticancerígena, antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, parasiticida, citotóxica, pesticida, tripanossomicida, entre outras (Tabela 1) (MEYER *et al.*, 1982; JÚNIOR, 2010; MOREIRA, 2013).

Tabela 1 - Aplicações de *Artemia salina* em bioensaios como modelo de avaliação de toxicidade de extratos vegetais.

Análises realizadas por meio de bioensaio com <i>Artemia salina</i>	Referências
Caracterização química e atividades biológicas <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de <i>Asemeia ovata</i> (polygalaceae)	ROCHA (2016)
Estudo fitoquímico e avaliação de toxicidade dos extratos de <i>Furcraea cubensis</i> frente a <i>Artemia salina</i> Leach	ALVES (2017)
Estudo químico e avaliação da atividade biológica de extratos de <i>Minquartia guianensis aubl.</i> (olacaceae)	SILVA (2018)
Composição fitoquímica e atividades biológicas de extratos de dez espécies da família <i>Melastomataceae</i> Juss	BOMFIM <i>et al.</i> (2020)
Estudo fitoquímico, toxicidade em <i>Artemia salina</i> (linnaeus, 1758) e atividade antibacteriana de <i>Pseudoxandra cuspidata maas</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2021)

Fonte: elaborado pela autora.

Dentre as metodologias empregadas para avaliação de extratos vegetais frente à *Artemia salina*, a proposta por Meyer *et al.* (1982), é a mais amplamente citada e utilizada. Conforme Moreira (2013) e Alves (2017) a partir dos resultados obtidos durante o processo experimental foi observada a existência da correlação entre o grau de toxicidade dos extratos analisados e a dose letal para aquela população. A partir de então, Souza, Costa e Castro (2019) colocam que são estabelecidos os parâmetros de DL₅₀ e CL₅₀ para caracterizar substâncias com potencial tóxico ou não. Os parâmetros citados são utilizados como forma de

identificação para a Dose Letal e Concentração Letal, respectivamente, que irão causar a morte de 50% de uma população testada em um tempo pré-estabelecido (MINHO; GASPAR; DOMINGUES, 2016).

Dessa forma, o teste de toxicidade frente à *Artemia salina* pode ser considerado um método extremamente versátil, pois, além de permitir uma avaliação de diversos compostos naturais, pode também ser utilizado em estudos para diferentes atividades biológicas, comprovando sua sensibilidade para a avaliação de toxicidade.

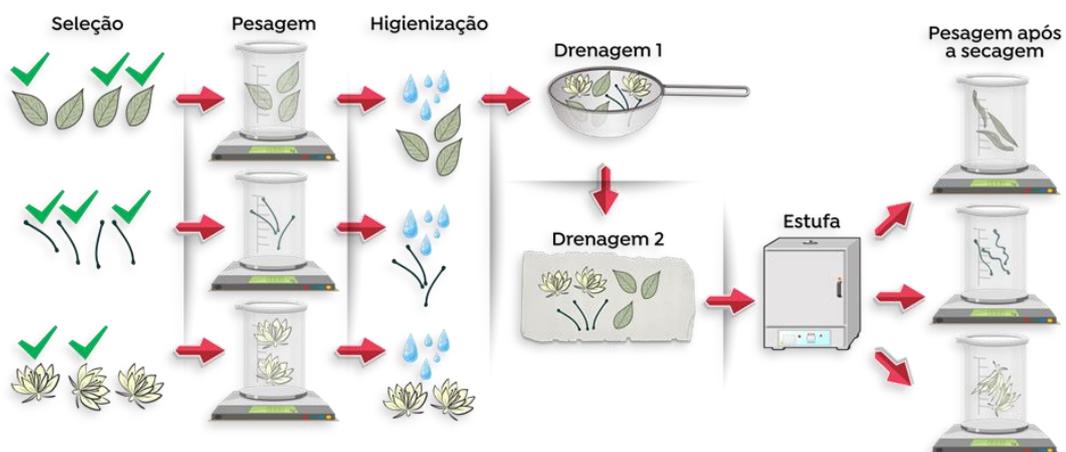
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado para as análises foi obtido na região do semiárido cearense, na cidade de Fortaleza/Ceará. As folhas, pecíolos e flores do Trapiá (*Crataeva tapia* L.) foram coletados entre os meses de setembro e outubro de 2022.

A matéria-prima, logo após a obtenção, seguiu para etapa de processamento primário e descarte de material com danos físicos e colorações amareladas. O material selecionado foi pesado e higienizado em água corrente para retirada de impurezas físicas, drenados e encaminhados para desidratação em estufa (modelo 119, marca SOC. FABBE), e submetido à secagem a 70°C durante 2 horas (Figura 5) (CANABARRO, 2019). Após o tempo determinado para a obtenção do material seco, realizou-se uma nova pesagem para o cálculo do rendimento.

Figura 5 – Processamento primário e secagem dos materiais vegetais.



Fonte: elaborado pela autora.

4.2 Rendimento do material vegetal

Os materiais vegetais foram expostos a pesagem antes e após a secagem, dessa forma foi realizado o cálculo do rendimento (%) sob base úmida referente a cada um deles, por intermédio da equação 1.

Equação 1 - Equação utilizada para cálculo do rendimento dos materiais vegetais após secagem.

$$Rt = \frac{Ps}{Pi} \times 100$$

Onde: Rt = Rendimento total do material vegetal (%);

Ps = Peso do material vegetal seco (g);

Pi = Peso inicial do material vegetal (g).

Fonte: Adaptado de Lima (2018).

4.3 Obtenção dos extratos vegetais brutos

A modalidade de extração adotada para a análise foi a do tipo sólido-líquido, onde o solvente (água destilada) foi submetido ao contato com o material vegetal sólido e ao final do processo ocorreu a formação do extrato aquoso (ARAKAKI, 2016). Os processos extrativos dos compostos bioativos (Figura 6) presentes nas folhas, flores e pecíolos do Trapiá, foram realizados por meio de três técnicas distintas, sendo elas, a maceração, a turbulização e a extração assistida por ultrassom, descritas posteriormente.

Figura 6 - Fluxograma do processo de extração dos compostos bioativos.



Fonte: elaborado pela autora.

Foram pesados aproximadamente 0,1g para cada material vegetal dispostos em Beckers de vidro, subsequentemente adicionou-se água destilada na proporção de 1:10 (massa vegetal seca (g):volume de solução extratora (mL)), resultando em uma concentração de 100.000 ppm.

4.3.1 Extração por maceração

Durante a técnica de maceração, as folhas, flores e pecíolos do Trapiá foram previamente pesados e adicionados cada um em um Becker contendo o solvente (água destilada) utilizado para o processo extrativo. Em seguida os frascos foram selados e mantidos sob temperatura ambiente (25°C) por um tempo pré-determinado de 24 horas (HANDA *et al.*, 2008).

Após o tempo estipulado, os materiais vegetais foram prensados e os sobrenadantes foram filtrados. Posteriormente os extratos obtidos foram acondicionados em frascos do tipo âmbar devidamente fechados, permanecendo sob temperatura de congelamento (-18°C), até o início dos testes.

4.3.2 Extração por turbolização

Na técnica de turbolização, o procedimento de extração ocorreu a partir do emprego de altas forças de cisalhamento. Seguindo a metodologia de Moura (2002), com adaptações, as folhas, flores e pecíolos, foram pesados, adicionados ao solvente e em seguida foram individualmente turbolizados em mixer durante o tempo de 1 min. Em sequência, as soluções foram filtradas e os extratos obtidos foram armazenados em frascos âmbar apropriadamente fechados e mantidos sob temperatura de -18 °C até o momento das análises.

4.3.3 Extração assistida por ultrassom

A extração consistiu na aplicação de ondas, por um banho ultrassônico (modelo Q335D, marca QUIMIS) operando com frequências entre 50 e 60 Hz e potência nominal de 70 W. As folhas, flores e pecíolos foram previamente pesados e dispostos separadamente em beakers contendo o solvente. Subsequentemente, os beakers foram expostos ao ultrassom

durante 8 min (CAVALHEIRO, 2013; GABRIEL, 2020). Tal processo causou a fragmentação das membranas celulares aumentando a interação entre as partículas do material vegetal e o solvente.

Após o tempo de 8 min, cada uma das soluções foi filtrada e acondicionada em frascos âmbar adequadamente fechados, sendo armazenados em condições de congelamento (-18°C), até o início dos testes.

4.4 Bioensaio de Letalidade frente à *Artemia salina*

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* necessita de um ambiente com condições específicas de incubação, para tal fez-se necessária à elaboração de um *habitat* artificial capaz de fornecer os parâmetros ideais para a eclosão dos cistos deste microcrustáceo. O *habitat* artificial foi composto por cloreto de sódio, cloreto de cálcio hidratado, sulfato de magnésio hidratado, cloreto de magnésio hidratado, cloreto de potássio e por fim carbonato de sódio, conforme quantidades descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Quantidades de reagentes utilizados para o preparo de 1L de solução de água salina.

Reagentes	Peso (g/L)
Cloreto de sódio	15,15
Cloreto de cálcio hidratado	9,88
Sulfato de magnésio hidratado	3,87
Cloreto de magnésio hidratado	3,13
Cloreto de potássio	0,41
Carbonato de sódio	0,11

Fonte: elaborado pelo autor.

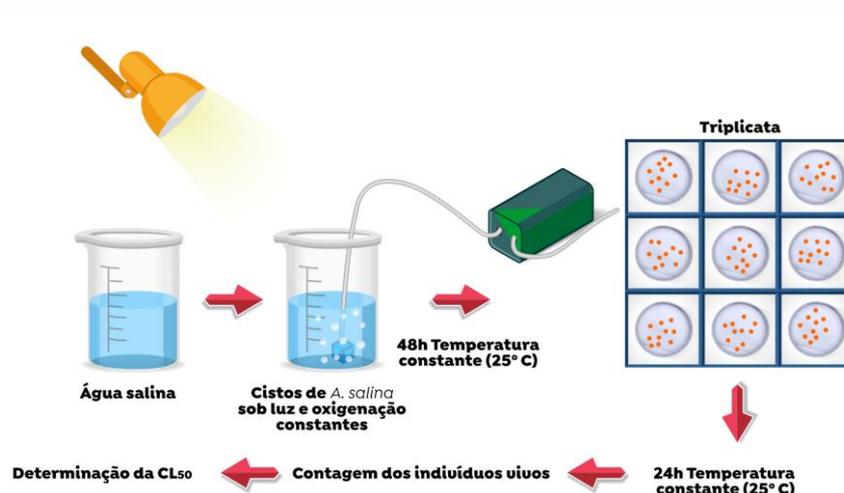
Utilizando como referência a metodologia de Meyer *et al.* (1982), adaptada, foi preparado o meio para eclosão (a água do mar artificial) também chamada de água salina dando início dessa forma ao bioensaio de toxicidade.

Após o preparo, o meio teve seu pH ajustado para o intervalo de 8-9 através da utilização de uma solução 0,1 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Os cistos do microcrustáceo foram adicionados à solução salina e permaneceram por um período de aproximadamente 48h sob condições constantes de temperatura (25°C), iluminação e

oxigenação com bomba de filtro.

Ao final da etapa de eclosão, os náuplios foram adicionados em frascos contendo 5 mL das amostras diluídas no meio artificial, na concentração de 1000 µg/mL, sendo cada frasco composto por um grupo contendo 10 unidades do microcrustáceo. Também foi utilizado o grupo controle negativo com a mesma quantidade de náuplios, porém estes expostos somente à água salina. Destaca-se ainda que o ensaio efetuado empregou 3 repetições para a concentração testada e foi realizado em triplicata. Ao final do período de 24h, foi contabilizado a relação de náuplios não sobreviventes e o valor de CL₅₀ foi determinado (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de preparação e execução do teste de toxicidade aguda frente à *Artemia salina*.



Fonte: Adaptado de Moreira (2013).

Após a realização do bioensaio de letalidade frente ao microcrustáceo, as amostras que não apresentaram toxicidade foram então submetidas ao teste de determinação da atividade antimicrobiana, por meio da técnica de difusão em ágar por poços.

4.5 Determinação da atividade antimicrobiana

4.5.1 Ativação das cepas de bactérias

Para a determinação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas duas cepas de bactérias, sendo uma Gram-negativa (*Salmonella Enteritidis*) e a outra Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*).

O processo de ativação das cepas consistiu em duas etapas. A primeira etapa foi realizada a partir das culturas de referência, por meio das quais foi realizado o esgotamento dos microrganismos por quadrante, nas superfícies das placas contendo Ágar TSA (Agar Tryptic Soy) que foram incubados a 35°C por 24 horas (ANVISA, 2006).

A segunda etapa ocorreu após a visualização dos resultados do esgotamento, retirando-se uma colônia isolada e passando-a para um tubo estéril contendo 5 mL de Caldo TSB (Trypticase Soy Broth), que também permaneceu incubado a 35°C por 24 horas (ANVISA, 2006; LABORCLIN, 2019). A concentração final da suspensão bacteriana após incubação foi de 10⁸ UFC/mL.

4.5.2 Método de difusão em ágar por poços

Para a técnica de difusão, foram utilizadas placas contendo ágar Mueller-Hinton inoculadas por semeadura em superfície utilizando swabs absorvidos com as respectivas suspensões bacterianas na ordem de 10⁸ UFC/mL. Em sequência, foram preparados poços medindo em torno de 4 mm de altura e 6 mm de diâmetro, onde adicionaram-se alíquotas de, aproximadamente, 50 µL/poço nas concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL dos extratos. Por fim, as placas foram incubadas por um período de 48h sob temperatura de 37 ± 2°C. O procedimento foi realizado em duplicata e foram empregados dois antibióticos como padrão de referência para o diâmetro dos halos formados, sendo eles a gentamicina e a amicacina (BrCAST/EUCAST, 2021).

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada mediante utilização de um paquímetro, medindo-se o diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos poços. Os resultados foram calculados a partir das médias dos valores obtidos e os resultados foram expressos em milímetros (mm).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimento do material vegetal

Os rendimentos dos materiais vegetais foram calculados sob base úmida, e seus resultados foram expressos na Tabela 3. Observa-se que os rendimentos dos materiais variaram entre 12,25 % e 16,91 %, sendo o maior rendimento verificado para as folhas do Trapiá.

Tabela 3 - Rendimento do material após processo de secagem.

Material Vegetal	Rendimento (%)
FOT	16,91
FT	14,88
PT	12,25

FOT= Folhas do Trapiá; FT= Flores do Trapiá; PT= Pecíolos do Trapiá.

Fonte: elaborado pela autora.

As folhas do Trapiá são compostas por 93 % de matéria seca, distribuídas entre valores de proteínas, fibras e minerais (SILVA *et al.*, 2015). De acordo com Corrêa *et al.* (2004), quando submetidas a processos de secagem, as matrizes vegetais sofrem redução de sua massa e este processo se dá como consequência da perda de umidade sofrida pelo material. Em suas pesquisas foi observado que as folhas de assa-peixe (*Vernonia polysphaera*) ao serem submetidas a etapa de secagem tiveram uma redução de $70 \pm 2,3$ % de sua massa seca em relação a sua massa fresca, apresentando rendimentos entre 27,7 % e 30,1 %.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira, Campos e Medeiros (2020), ao realizarem a secagem de folhas do umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arruda*) para a produção de farinha, onde foi verificado que após o procedimento de secagem foi encontrado o rendimento médio de 23,50 %.

Por outra perspectiva, o presente estudo apresentou rendimento máximo de 16,91 %, indicando o menor resultado se comparado aos rendimentos obtidos por Corrêa *et al.* (2004) e Ferreira, Campos e Medeiros (2020). Essa diferença se faz possível devido aos vários fatores que podem influenciar diretamente no rendimento dos materiais vegetais, como o método de secagem empregado, a composição, o tipo de material vegetal analisado, o tempo e a temperatura de exposição (CANABARRO, 2019).

5.2 Bioensaio de Letalidade frente à *Artemia salina*

Os resultados do teste de toxicidade aguda aplicado aos extratos vegetais frente à *Artemia salina* ocorreram através da contabilização dos náuplios não sobreviventes para a concentração testada de 1000 µg/mL (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do teste de toxicidade frente à *Artemia salina*.

Extratos	Mortalidade	CL₅₀
-----------------	--------------------	------------------------

FOTT	8,64 %	> 1000 µg/mL
FOTM	25,93 %	> 1000 µg/mL
FOTU	19,75 %	> 1000 µg/mL
FTT	29,63 %	> 1000 µg/mL
FTM	61,73 %	< 1000 µg/mL
FTU	58,02 %	< 1000 µg/mL
PTT	12,35 %	> 1000 µg/mL
PTM	25,93 %	> 1000 µg/mL
PTU	22,22 %	> 1000 µg/mL

FOTT= Extrato aquoso folhas do Trapiá pelo método de turbolização; FOTM= Extrato aquoso das folhas do Trapiá pelo método de maceração; FOTU= Extrato aquoso das folhas do Trapiá pelo método de ultrassom; FTT= Extrato aquoso das flores do Trapiá pelo método de turbolização; FTM= Extrato aquoso das flores do Trapiá pelo método de maceração; FTU= Extrato aquoso das flores do Trapiá pelo método de ultrassom; PTT= Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de turbolização; PTM= Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de maceração; PTU= Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de ultrassom.

Fonte: elaborado pela autora.

A partir dos valores obtidos com a contagem de náuplios, foram então calculadas as taxas de mortalidade (%) para cada extrato, utilizando-se como referência a taxa limite de 50 % de mortalidade. Os valores supracitados variaram de 8,64 % a 61,73 %, indicando por conseguinte que extratos com mortalidades superiores a 50 % apresentaram CL_{50} inferiores a 1000 µg/mL. Ainda, para o grupo de náuplios do controle negativo, que foi submetido somente à solução sintética de água salina, foi atribuída à taxa de sobrevivência de 100 %.

Segundo a metodologia de Meyer *et al.* (1982), as substâncias podem ser consideradas atóxicas quando seus valores de CL_{50} são superiores a 1000 µg/mL, dessa forma nota-se que dentre as amostras analisadas, os extratos FOTM, FOTT, FOTU, FTT, PTT, PTM e PTU apresentaram-se atóxicos frente ao microcrustáceo.

De forma semelhante, estudos realizados por Lopes (2020), avaliando a toxicidade dos extratos etanólicos obtidos a partir da entrecasca do caule da *Crataeva tapia* L. (Trapiá), comprovaram uma CL_{50} superior a 1000 µg/ml, indicando que os extratos obtidos não eram tóxicos à *Artemia salina*.

Os extratos FTM e FTU apresentaram efeito tóxico sobre o microcrustáceo, demonstrando taxa de mortalidade superior a 50%. Dessa forma, a avaliação preliminar da toxicidade dos extratos produzidos a partir das folhas, flores e pecíolos, frente à *Artemia*

salina, apresentaram toxicidades distintas. Dentre estes, destacam-se os extratos aquosos das flores do Trapiá, citados anteriormente, obtidos através dos processos extrativos de maceração e assistido por ultrassom, que apresentaram alta toxicidade ($CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$), inviabilizando suas possíveis aplicações em produtos da indústria alimentícia.

Ademais, observando-se também as metodologias extrativas empregadas, é perceptível que para ambas as matrizes vegetais analisadas, o método de turbolização demonstrou-se como mais eficaz em nível de toxicidade, apresentando menores índices de mortalidade dos náuplios. Este resultado pode estar atrelado ao intervalo de tempo relativamente curto em que ocorre o processo extrativo, tornando propícia a não dissolução de compostos potencialmente tóxicos no solvente, acarretando, dessa forma, na diminuição da mortalidade dos microcrustáceos.

5.3 Método de difusão em ágar por poços

Os extratos obtidos das folhas, flores e pecíolos do Trapiá (*Crataeva tapia* L.), que não apresentaram toxicidade, foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana, por meio da técnica de difusão em ágar por poços, obtendo-se como resultados os valores descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos extratos das folhas, flores e pecíolos do Trapiá (*Crataeva tapia* L.).

Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Salmonella Enteritidis</i>		
	Concentrações					
	100%	50%	25%	100%	50%	25%
FOTM	-	-	-	-	-	-
FOTT	-	-	-	-	-	-
FOTU	-	-	-	-	-	-
FTT	-	-	-	-	-	-
PTM	9 mm	-	-	-	-	-
PTT	-	-	-	-	-	-
PTU	-	-	-	-	-	-

FOTM= Extrato aquoso das folhas do Trapiá pelo método de maceração; FOTT= Extrato aquoso folhas do Trapiá pelo método de turbolização; FOTU= Extrato aquoso das folhas do Trapiá pelo método de ultrassom; FTT= Extrato aquoso das flores do Trapiá pelo método de turbolização; PTM= Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de maceração; PTT= Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de turbolização; PTU= Extrato aquoso dos pecíolos do Trapiá pelo método de ultrassom.

Fonte: elaborado pela autora.

Os halos de inibição formados tiveram seus diâmetros medidos e os resultados obtidos foram calculados através da média aritmética das duplicatas, sendo expressos em milímetros. Por conseguinte, seus valores foram comparados a dois antibióticos de referência, sendo eles a amicacina (halo= 21,5 mm) e a gentamicina (halo= 15,5 mm), um com espectro de ação sobre bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e o outro sobre gram-negativas (*S. Enteritidis*), respectivamente.

S. aureus não apresentou susceptibilidade aos extratos FOTM, FOTT, FOTU, FTT, PTT e PTU em nenhuma das concentrações testadas, de forma análoga, os mesmos extratos também não apresentaram efeito inibitório frente à *S. Enteritidis*. Já o extrato PTM apresentou halo de inibição de 9 mm para a concentração de 100 mg/mL, demonstrando atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, com uma inibição de 41,86 % representando aproximadamente metade da capacidade de inibição apresentada pelo antibiótico de referência amicacina. Em contrapartida, não apresentou nenhum efeito sobre *S. Enteritidis*.

Tortora, Funke e Case (2012), explicam que bactérias gram-positivas, como é o caso do *S. aureus*, de forma geral, não são consideradas resistentes a alguns antibióticos, tornando-se suscetíveis a substâncias que atuam principalmente na lise da parede celular. Por outro ângulo, as bactérias gram-negativas, como *S. Enteritidis* são mais resistentes por possuírem uma camada externa complexa que inviabiliza a penetração dos antibióticos, o que pode explicar o resultado obtido para o extrato PTM.

Considerando a maioria dos extratos, Cabral (2014) apresentou em suas análises resultados semelhantes, já que testando a atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico da casca do caule da *C. tapia* frente às cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* não foi observada relevância, uma vez que a concentração máxima utilizada de 1024 µg/mL não demonstrou capacidade de inibição do crescimento destes microrganismos.

Por outra perspectiva, os estudos efetuados por Sharma *et al.* (2014), demonstram resultados positivos quanto ao extrato aquoso das folhas da *Crataeva tapia* L. obtidos através do método de extração sob refluxo, apresentando zona máxima de inibição por *Staphylococcus aureus* de 19 mm. Entretanto, analisando os extratos etanólicos e de éter de petróleo desse mesmo material vegetal, constatou-se que estes foram mais eficientes, por possuírem halos de inibição com 23 mm e 20 mm, respectivamente.

Este comportamento está diretamente relacionado com a polaridade/afinidade intrínseca dos compostos presentes no material vegetal, que por consequência afeta a

solubilização do mesmo com o solvente empregado para as análises. De acordo com as pesquisas de Sharma *et al.* (2014) as folhas do Trapiá demonstraram maior afinidade por substâncias apolares, evidenciando que a matriz vegetal analisada também possui natureza apolar, logo tornando-se menos solúvel em água.

É importante salientar que assim como a polaridade, os métodos extrativos empregados também são de extrema valia para a obtenção de bons resultados, uma vez que de acordo com o método aplicado, maior ou menor será o teor de compostos bioativos com capacidade antimicrobiana presentes nos extratos, no qual neste trabalho o método de maceração foi o único em que se obteve extração de compostos com atividade antimicrobiana, para o solvente e condições utilizadas nesta pesquisa.

Por fim, Fernandes (2013) destaca que, os processos de concentração dos extratos, tais como a liofilização ou a rotaevaporação, que não foram aplicados aos extratos em estudo, são de grande relevância, pois podem colaborar consideravelmente para o aumento da estabilidade do produto extraído e a concentração dos princípios ativos presentes na amostra, atuando na potencialização de seus efeitos. Ressalta-se também a temperatura utilizada para a secagem do material vegetal, que pode ter interferido na degradação de compostos com atividade antimicrobiana.

6 CONCLUSÃO

Pode-se observar que os extratos aquosos do Trapiá em sua grande maioria apresentaram atoxicidade ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Quanto a atividade antimicrobiana, o extrato obtido por meio do pecíolo do Trapiá, através do processo extrativo de maceração (PTM) destacou-se por ser o único a apresentar a formação de halo de inibição frente a *S. aureus*. Tais resultados ressaltam a importância da realização de novas pesquisas com a *Crataeva tapia* L. e suas partes, dessa forma sua potencialidade de uso será mais evidenciada e sua aplicação em produtos da indústria alimentícia poderá ser considerada.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, G. F. **Avaliação do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais para aplicação como aditivo em filmes/ revestimentos para alimentos.** Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 133p, Diamantina, 2018.
- ALVES, F. da S. **Estudo fitoquímico e avaliação de toxicidade dos extratos de *Furcraea cubensis* frente à *Artemia Salina Leach*.** UFPB/CCEN, João Pessoa, 2017.
- ANDRADE, M. A. **Inoculação de *Salmonella enterica* subespécie entérica sorovar enteridis fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte.** Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.
- ANVISA. **Controle interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobianos - Projeto monitoramento e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde.** OPAS/ANVISA/CVS; 2006.
- ARAKAKI, C. Y. **Extração sólido-líquido em sistema de análise em fluxo para a determinação de fósforo solúvel em materiais vegetais.** Bacharelado em Química. Santo André - SP. 2016.
- ARRUDA, M. D. M. **Caracterização da lignina das folhas de *Crataeva tapia* e seu potencial em formulações medicinais e cosméticas.** Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2021.
- AZEVEDO, R. de S.; SILVA, K. W. L. da.; SILVA, K. B. da.; SANTOS, A. F. dos.; COSTA, J. G. da. **Potencial antioxidante de *Crataeva tapia* L.** In: Reunião anual da sociedade interamericana de horticultura tropical, Manaus. Embrapa, Brasília, DF, p.146, 2015.
- BARROS, D. de M. *et al.* **Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares / Potential Use of Natural Antimicrobial Systems as Food Conservatives.** Brazilian Journal of Development, [S. l.], v. 6, n. 6, p.40476–40491, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n6-547.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais.** Visão Acadêmica, Curitiba, v.11, n.2, 2010.
- BOMFIM, E. M. S.; COELHO, A. A. O. P.; SILVA, M. C.; MARQUES, E. J.; VALE, V. L. C. **Composição fitoquímica e atividades biológicas de extratos de dez espécies da família *Melastomataceae* Juss.** Brazilian Journal of Biology. v. 82, 2022.
- BONA, E. A. M. de; PINTO, F. G. da S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. **Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.
- BONDI, M.; LAUKOVÁ, A.; NIEDERHAUSERN, S. de.; MESSI, P.; PAPADOPOULOU, C. **Natural preservatives to improve food quality and safety.** Journal of Food Quality, [s.

l.], 2017.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. **Metabólitos secundários de plantas**, Revista Agrotecnologia, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Ceará: inventário florestal nacional: principais resultados**. Serviço Florestal Brasileiro. Brasília. 108 p., 2016. Disponível em: https://www.semace.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/46/2016/12/ifn_ce_2016_final.pdf. Acesso em: 11 out. 2022.

BrCAST - **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos V. 9.0**, janeiro de 2021 do EUCAST. Disponível em: < <http://brcast.org.br/> > Acesso em 01 nov. 2022

CABRAL, D. L. de V. **Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como antiinflamatórias**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 79p, 2014.

CAETANO, F.; PAGANO, M. **Prevalência de infecções causadas por *Samonella sp.* no Brasil no período de 2013 a 2017**. J. Infect. Control, p.56-62, 2019.

CAMPOS, A. C. C. **Antimicrobianos - Generalidades** (Parte 1). Goiânia, p.258, 2014.

CAMPOS, J. B.; CORREIA, A. R.; CRUZ, D. C.; MENEZES, A. C. S. **Avaliação da Toxicidade frente *Artemia salina* de extratos obtidos das folhas de *Andira Paniculata Benth.*** Universidade Estadual de Goiás, Anápolis - GO, 79p., 2020.

CANABARRO, N. I. **Secagem convectiva de folhas visando à obtenção de compostos bioativos via extração supercrítica**. Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. São Carlos – SP. 2019.

CARNEIRO, R. T. O.; BADARI, J. C. **O que são antimicrobianos?**. Potencial Biótico, 2022. Disponível em: <<https://www.potencialbiotico.com/post/oquesaoantimicrobianos>>. Acesso em: 21 out. 2022.

CAVALCANTE, M. de A. **Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Belém, 2011.

CAVALHEIRO, C. V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea L.*** Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Santa Maria, RS, Brasil, 2013.

CORDEIRO, M. M. **Caracterização molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados no Hospital Municipal de Ipatinga/MG**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

CORNEJO, X.; MACIEL, J. R.; MARQUES, J.S.; NETO, R.L.S.; COSTA-E-SILVA, M.B. ***Capparaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB100861>>. Acesso em: 12 out. 2022.

CORRÊA, R. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; ALVES, T. L. **Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 28, n. 2, p. 339-344, mar./abr., 2004.

COSTA, T.; JORGE, N. **Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes.** UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde, v. 13, n. 3, p. 195-203, 2011.

DEL RÉ, P. V; JORGE, N. **Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v. 14, n. 2, p.389-399, 2012.

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

FERNANDES, M. dos R. V. **Padronização e avaliação biológica de extratos secos de Psidium guajava L. obtidos por spray drying.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP. 2013.

FERREIRA, S. V. de F.; CAMPOS, A. R. N.; MEDEIROS, M. F. T. **Elaboração e caracterização de produto farináceo a partir da folha de umbuzeiro (Spondias tuberosa Arruda).** Research, Society and Development, v. 9, n. 10, e1309108295, 2020.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Agentes antimicrobianos químicos e naturais,** 2010. Disponível em: https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060739062001465320470.pdf. Acesso em: 22 out. 2022.

FREITAS, F. A. de.; MESQUITA, A. J. de.; SOLA, M. C.; MOREIRA, N. M.; SENA, E. L. de S. **Estratégias de evasão de Staphylococcus aureus à imunidade inata.** Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer – Goiânia. v. 9, n. 17, 1330 p. 2013.

GABRIEL, L. C. **Extração assistida por banho ultrassônico de óleo de café verde (Coffea arabica) utilizando etanol e hexano como solventes e caracterização dos extratos por cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.** Dissertação - Programa de Pós-Graduação Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

GOMES, E. L. **A Artemia salina - A utilização de artemias como indicador natural de poluição no ambiente aquático.** Biologia Acontecendo. 2012.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n. 3, p.353-358, jul./set. 2005.

HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.** Trieste: ICS Unido. p.266, 2008.

HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella sp.*** Evidência, Joaçaba, v. 7, n. 2, p.93-100, 2009.

HESS, S. C. **Ensaio sobre a poluição ambiental no Brasil.** Expressões – São Paulo. 1 ed. 344p. 2018.

HIROTA, B. C. K.; PAULA, C. S.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. **Avaliação de toxicidade *in vitro*: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*.** Visão Acadêmica, Curitiba, v.13, n.2, 2012.

JÚNIOR, H. B. P. **Efeitos toxicológicos agudos de extratos de *Melia azedarach* (*Meliaceae*) em ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*) e *Artemia salina*.** Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2010.

KAMEL, C. **A novel look at a classic approach of plant extracts.** Feed Mix – The International Journal on Feed, Nutrition and Technology – Special: Alternatives to antibiotics. Doetinchen, p.19-21, 2000.

LABORCLIN. **Cepas lb derivadas.** Rev. 06 – 2019. Disponível em: <<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/CEPAS-2.pdf>> Acesso em 11 nov. 2022

LACERDA, F. C. B. **Citotoxicidade de aditivos alimentares sintéticos utilizados na dieta humana.** Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 2017.

LIMA, B. G. de. **Caatinga espécies lenhosas e herbáceas. 1ª. ed. Mossoró: EDUFERSA editora universitária.** v.3000, 316p., 2012.

LIMA, C. B. **Potencial biológico dos extratos obtidos da folha do cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith) sobre bactérias transmitidas por alimentos.** Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2018.

LOPES, C.B. **Estudo etnobotânico, avaliação citotóxica, antimicrobiana e antioxidante de plantas medicinais da comunidade Quilombola Timbó, Pernambuco – Brasil.** Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 195p., 2020.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** Nova Odessa. Plantarum. 5ed, 384p., 2008.

MAIA, A. B.; NASCIMENTO, A. R. A. do; VIDAL, Y. P.; CAVALCANTE, R. F. **Teste de toxicidade com *Artemia salina* e sua importância no controle de parâmetros ambientais.** II Colóquio de estudos ambientais do bioma caatinga - Instituto Federal do Ceará, Campus Quixadá, 6 p., 2018.

MAIA, P. P.; RATH, S.; REYES, F. G. R. **Antimicrobianos em Alimentos de Origem Vegetal – Uma Revisão.** Segurança alimentar e nutricional. 16p., 2009.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Salmonelas.** Programa Nacional de Sanidade Avícola – PNSA, 2021.

MARQUES, H. L. **Salmonella Enteritidis e seus mecanismos de ação.** Avicultura Industrial, 2017.

MASCARENHAS, R. M. G.; LIMA, C. A.; RODRIGUES, R. P.; KITAGAWA, R. R.; FARAONI, A. S.; OLIVEIRA, T. B. **Avaliação de toxicidade geral em constituintes alimentares utilizando ferramentas *in silico*.** Rev. Virtual Quim. v. 11, n. 2, p.543-553, 2019.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 3 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, p.112, 2007.

MELO, V. V.; DUARTE, I. de P.; SOARES, A. Q. **Guia Antimicrobianos. Guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG) - 1.ed., 62 p., Goiânia, 2012.**

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J.L. **Brineshrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.

MINHO, A. P.; GASPAR, E. B.; DOMINGUES, R. **Guia prático para determinação de curva Dose-Resposta e Concentração Letal em bioensaios com extratos vegetais.** Comunicado Técnico, 8p. Embrapa Pecuária Sul. Bagé, RS, 2016.

MONTEIRO, S. D. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos leóricos e Aplicação.** Sustinere - Revista de Saude e Educacao, v. 5, Cap. 1, ed. 2, 13p., 2017.

MOREIRA, L. A. de O. **Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach. de extrato de duas espécies da família *Melastomataceae*.** Anápolis: IFG. 2013.

MOURA, K. A. **Efeito do extrato aquoso de alho sobre a qualidade microbiológica de frangos resfriados,** Tese, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

MOURA, N.; VASCONCELOS, A. C.; BERNABÉ, B.; TEIXEIRA, L. J.; SARAIVA, S. **Ensaio toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*.** Enciclopédia biosfera, [S. l.], v. 8, n. 15, 2012.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.** 19° Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition.** NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NETO, R.L. S.; LUBER, J. **Capparaceae in Flora do Brasil 2020.** Jardim Botânico do Rio

de Janeiro. 2020. Disponível em:<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB100861>.

NOGUEIRA, A. N.; MACEDO, R. C. B. S.; RABELO, J. L. G.; MENDONÇA, L. P. **Substâncias bioativas como conservantes naturais em alimentos**. I Congresso internacional de meio ambiente e sociedade e III Congresso internacional da diversidade do semiárido. v. 1, 17p., Campina Grande, 2019.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* **Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra cuspidata* Maas**. Plantas medicinais do estado do Amapá: dos relatos da população à pesquisa científica, cap 12, p 153-165, 2021.

OLIVEIRA, R. da S.; LUCAS, C. P.; ANTONUCCI, G.; DA SILVA, F. C. **Compostos bioativos naturais: agentes promissores na redução do estresse oxidativo e processos inflamatórios**. South American Journal of Basic Education, Technical and Technological, [S. l.], v.5, n.2, 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/1643>. Acesso em: 11 out. 2022.

OLIVEIRA, T. R. M. de. ***Staphylococcus aureus* em alimentos como problema de saúde pública: uma revisão**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Nutrição. Natal, RN, 2021.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais**. Rev. bras. Farmacogn, 2008.

PARREIRA, A. G.; FERREIRA, L. V. S.; PEREIRA, F. R.; CORREA, E. J. A.; GRANJEIRO, P. A.; ALMEIDA, J. M. D. **Potencial antimicrobiano de extratos vegetais da região de Divinópolis/MG**. Editora UFMG, Cap 5, p.116 – 143, 2019. Disponível em: <https://editora.uemg.br/images/livros-pdf/catalogo-2020/Vol_Pesquisa/Vol_Pesquisa_cap5.pdf>. Acesso em: 22 out. 2022.

PEREIRA, J. M. G.; FORMIGONI, M.; VIELL, F. L. G.; PANTE, G. C.; BONA, E.; VIEIRA, A. M. S. **Aditivos alimentares naturais emergentes: Uma revisão**. Realidade e Perspectivas em Ciência dos Alimentos. Editora Pantanal, Cap 3, p.46 – 75, Nova Xavantina, 2020.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I.; THOMSON, W. J. **Bioassay techniques for drug development**, Harwood academic publishers, 2001.

RIZZO, P. V.; MENTEN, J. F. M.; RACANICCI, A. M. C.; TRALDI, A. B.; SILVA, C. S.; PEREIRA, P. W. Z. **Extratos vegetais em dietas para frangos de corte**, Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, n.4, p.801-807, 2010.

ROCHA, J. L. C. **Caracterização química e atividades biológicas *in vitro* e *in silico* de *Asemeiaovata* (Polygalaceae)**. 2016.

RODRIGUES, E. F.; JÚNIOR, A. H. da S.; OLIVEIRA, C. R. S. de; LOURENÇO, L. A.; SIMÃO, L. **Antimicrobianos naturais na conservação de alimentos – Uma revisão.** Inovação, gestão e sustentabilidade na agroindústria. II CIAGRO. 14p., Recife, 2021.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. **Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity.** Letters in Applied Microbiology. v. 32, ed. 5, p.293-297, 2001.

SAVIA, D. B. **Resistência antimicrobiana ameaça a saúde pública mundial.** Food Safety Brazil. 2021. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/resistencia-antimicrobiana-ameaca-saude-publica/>>. Acesso em: 21 out. 2022.

S.B.T. INVESTMENTS HOLDING Ltd. **Artemia là gì?**, 2020. Disponível em: <<https://m.vk.com/@sbartemiavn-artemia-l-g>> Acesso em: 30 out. 2022

SHARIF, Z.; MUSTAPHA, F.; JAI, J.; MOHD YUSOF, N.; ZAKI, N. **Review on methods for preservation and natural preservatives for extending the food longevity.** Chemical Engineering Research Bulletin, [s. l.], v. 19, p. 145, 2017.

SHARMA, P.; PATIL, D.; DHALIWAL, M. K.; PATIL, A. **Antibacterial Activity of Leaf and Bark Extracts of *Crataeva tapia* L.** International Journal for Pharmaceutical Research Scholars. v. 3, i. 4, 2014.

SHARMA, P.; PATIL, D.; PATIL, A. **Crataeva tapia Linn. - an important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties.** International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. v.4, n.1, p.582-589, 2013.

SILVA, B. M. da.; SONEHARA, I. Y. **Metodologias de determinação de sensibilidade antimicrobiana aplicadas a extrato vegetal bruto (Hidroalcoólico): Comparação entre duas técnicas de difusão em ágar.** XIV Jornada de Iniciação Científica e VIII Mostra de Iniciação Tecnológica. Universidade Presbiteriana Mackenzie - 19p., 2018.

SILVA, E. B. **Antimicrobianos.** In: Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda; Maria Paula Gomes Mourão; Antonio Magela Tavares. (Org.). Manual de Rotinas da Fundação Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, p.37 - 46, 2003.

SILVA, J. C. de S.; CAETANO, L. C.; DELLANE, S.; ABDALLA, A. L.; SILVA, N. V. da. **Nutritional quality of Trapiá (*Crataeva tapia* L.) from the Caatinga Biome.** Quest Journals. Journal of Research in Agriculture and Animal Science. v. 3, i. 1, p.1 – 5, 2015.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** São Paulo :Blucher, 5. ed., 560p., 2017.

SILVA, P. A. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de extratos de *Minuartia guianensis* AUBL. (*Olacaceae*).** 2018.

SILVA, R. N. R. da.; MARQUES, C. A. T.; CONSTANT, P. B. L. **Uso de conservantes naturais em alimentos: um referencial teórico.** Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisa e práticas contemporâneas. v. 2, Cap. 55, p.775 – 786, 2021.

SILVEIRA, L. M. da S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. de L. N.; MENDES, J. C. **Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão**. Revista Brasileira de Farmacognosia, São Paulo, v. 90, n.2, p.124-128, 2009.

SOUSA, L. D. N. de. **Estudo dos agentes polinizadores na inflorescência do Trapiá (*Crataeva tapia*)**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia, Recife, 2019.

SOUZA, B. A.de; PIAS, K. K. S.; BRAZ, N. G.; BEZERRA, A. S. **Aditivos alimentares: aspectos tecnológicos e impactos na saúde humana**. Revista Contexto & Saúde, [S. l.], v. 19, n. 36, p.5–13, 2019.

SOUZA, K. L. G. de.; COSTA, M. B.; CASTRO, R. A. B. **Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica frente *Artemia salina* do caule da *pithecoctenium crucigerum* (pente-de-macaco) *bignoniaceae***. 59º Congresso Brasileiro de Química. João Pessoa, Paraíba. 2019.

SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B. ; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. **Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos**. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos, Itajaí : Editora da UNIVALI, 2003.

SPRADA, E. **Toxicologia**. Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica. Ministério da Educação. Curitiba – PR, 2013.

TIMENETSKY, J. **Antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos)**. Departamento de Microbiologia. Universidade de São Paulo, 2017.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**, 10ª Ed. Porto Alegre: Artmed. 967p, 2012.

ZHANG, F.; WALCOTT, B.; ZHOU, D.; GUSTCHINA, A.; LASANAJAK, Y.; SMITH, D. F.; FERREIRA, R. S.; CORREIA, M. T.; PAIVA, P. M.; BOVIN, N. V.; WLODAWER, A.; OLIVA, M. L.; LINHARDT, R. J. **Structural studies of the interaction of *Crataeva tapia* bark protein with heparin and other glycosaminoglycans**. *Biochemistry*, 2013.