

Soares, LA & Santana, LCLA. (2020). Predictive evaluation of in vitro growth of pathogenic bacteria under different conditions of pH, temperature and concentrations of sodium chloride and extracts of tamarind residues. *Research, Society and Development*, 9(7):1-22. e162973858.

Avaliação preditiva do crescimento *in vitro* de bactérias patogênicas em diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de cloreto de sódio e extratos de resíduos de tamarindo

Predictive evaluation of in vitro growth of pathogenic bacteria under different conditions of pH, temperature and concentrations of sodium chloride and extracts of tamarind residues

Evaluación predictiva del crecimiento in vitro de bacterias patógenas en diferentes condiciones de pH, temperatura y concentraciones de cloruro de sodio y extractos de residuos de tamarindo.

Recebido: 22/04/2020 | Revisado: 23/04/2020 | Aceito: 29/04/2020 | Publicado: 04/05/2020

Larissa de Almeida Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4556-091x>

Universidade Federal de Sergipe, País

E-mail: larissasoaresgbi@gmail.com

Luciana Cristina Lins de Aquino Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7231-2199>

Universidade Federal de Sergipe, Brasil

Email: aquinoluciana@hotmail.com

Resumo

A microbiologia preditiva tem sido aplicada, através de modelos matemáticos, com o intuito de prever o comportamento de microrganismos quando expostos à condições de crescimento variadas. Esta ciência tem ganhado destaque visto que permite prever taxas de crescimento e duração da fase lag de microrganismos patogênicos contaminantes de alimentos. Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar o efeito da temperatura (10 a 45°C), pH (5,0 a 9,0), concentração de cloreto de sódio (0 a 8,5%) e concentração de extrato de casca e de semente de tamarindo em etanol 80% (0 a 10%) no crescimento *in vitro* de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* e *Enterococcus faecalis*. Os parâmetros foram avaliados segundo planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3

pontos centrais. As bactérias foram incubadas nas condições propostas e o modelo primário de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados experimentais (coeficientes de correlação entre 0,72 e 1,00) obtendo-se as taxas de crescimento e o tempo da fase lag. Para a maiorias das condições testadas, houve a inibição do crescimento para todas as bactérias obtendo-se taxas que variaram entre -0,03 e -6,04 Log UFC/mL h. Através da análise estatística verificou-se que o pH foi o parâmetro que mais influenciou para a inibição das bactérias. No entanto, o extrato de casca e de sementes de tamarindo foi o principal componente para a inibição de *S. Enteritidis*. Neste estudo realizou-se a predição do crescimento *in vitro* de bactérias patogênicos em meio de cultivo contendo extrato de casca ou de sementes de tamarindo, tendo este demonstrado potencial para ser utilizado em aplicações futuras como antimicrobiano natural.

Palavras-chave: Microbiologia preditiva; Antimicrobiano; Resíduo de fruta.

Abstract

Predictive microbiology has been applied, through mathematical models, in order to predict the behavior of microorganisms when exposed to varied growth conditions. This science has gained prominence since it allows to predict growth rates and lag phase duration of contaminating pathogenic microorganisms in food. In this context, this work aimed to evaluate the effect of temperature (10 to 45°C), pH (5.0 to 9.0), sodium chloride concentration (0 to 8.5%) and concentration of tamarind peel and seeds extract in 80% ethanol (0 to 10%) in the *in vitro* growth of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis and *Enterococcus faecalis*. The parameters were evaluated according to fractional factorial design 2^{4-1} plus 3 central points. The bacteria were incubated under the proposed conditions and the primary model of Baranyi and Roberts was adjusted to the experimental data (correlation coefficients between 0.72 and 1.00), being obtained growth rates and lag time. For most conditions tested, growth was inhibited for all bacteria, with rates ranging from -0.03 to -6.04 Log UFC/mL h. From statistical analysis, it was verified that the pH was the parameter that most influenced the inhibition of bacteria after. However, the extract of tamarind peel and seeds was the main component for the inhibition of *S. Enteritidis*. In this study, the *in vitro* growth of pathogenic bacteria in a culture medium containing tamarind peel or seeds extract was predicted. These extracts showed potential to be used in future applications as a natural antimicrobials.

Keywords: Predictive microbiology; Antimicrobial; Residue of fruit.

Resumén

La microbiología predictiva se ha aplicado, a través de modelos matemáticos, para predecir el comportamiento de los microorganismos cuando se exponen a condiciones de crecimiento variadas. Esta ciencia ha ganado importancia ya que permite predecir las tasas de crecimiento y la duración de la fase de retraso de los microorganismos patógenos contaminantes en los alimentos. En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la temperatura (10 a 45°C), pH (5.0 a 9.0), concentración de cloruro de sodio (0 a 8.5%) y concentración de extracto de corteza y de semillas de tamarindo en etanol al 80% (0 a 10%) en el crecimiento in vitro de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis y *Enterococcus faecalis*. Los parámetros se evaluaron de acuerdo con el diseño factorial fraccional 2^{4-1} más 3 puntos centrales. Las bacterias se incubaron en las condiciones propuestas y el modelo primario de Baranyi y Roberts se ajustó a los datos experimentales (coeficientes de correlación entre 0,72 y 1,00) para obtener tasas de crecimiento y tiempo de retraso. Para la mayoría de las condiciones probadas, el crecimiento se inhibió para todas las bacterias, con tasas que van desde -0.03 a -6.04 Log UFC/mL h. A través del análisis estadístico se descubrió que el pH era el parámetro que más influía en la inhibición de las bacterias. Sin embargo, el extracto de corteza y semillas de tamarindo fue el componente principal para la inhibición de *S. Enteritidis*. En este estudio, se predijo el crecimiento in vitro de bacterias patógenas en un medio de cultivo que contenía extracto de semillas de corteza o tamarindo, lo que demostró el potencial para ser utilizado en futuras aplicaciones como antimicrobiano natural.

Palabras clave: Microbiología predictiva; Antimicrobiano; Residuos de fruta.

1. Introdução

O controle de bactérias patogênicas continua sendo um desafio para a indústria de alimentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), a contaminação de alimentos seja de ordem química, física ou microbiológica pode gerar mais de 200 tipos de doenças. A estimativa é que após a ingestão de algum alimento contaminado 1 a cada 10 pessoas apresente algum quadro de patologia e que por ano uma média de 420.000 pessoas apresentem quadro de óbito por ingestão de alimentos contaminados. O que torna as doenças transmitidas por alimentos uma questão preocupante em nível de saúde pública mundial (Xie et al., 2019). De modo a garantir a segurança alimentar, profissionais do segmento industrial,

empresas de consultoria e institutos voltados à pesquisa têm apostado na microbiologia preditiva e quantificação de risco microbiano (Rodríguez et al., 2018).

A microbiologia preditiva relaciona as taxas de crescimento, sobrevivência e morte de microrganismos aos fatores ambientais aos quais eles são expostos tais como: temperatura, pH, atividade de água, conservantes e compostos antimicrobianos (Stringer & Metris, 2017). O comportamento de patógenos frente a esses fatores pode ser estudado com o auxílio de programas computacionais gratuitos que contêm modelos matemáticos preditivos como o “USDA Pathogen Modeling Program (PMP)” e “ComBase Predictor” (Juneja et al., 2019). Os modelos matemáticos tornam possível, por exemplo, o conhecimento do crescimento de bactérias durante a mudança de temperatura em diferentes etapas do processamento. Os modelos que abrangem a temperatura como um dos parâmetros pode ser uma ferramenta eficaz para prever prazos de validade de um produto, além de determinar a patogenicidade ou deterioração (Teleken et al., 2018; Rodríguez et al., 2018).

Dentre os modelos existentes, aqueles chamados primários são utilizados para descrever o crescimento de microrganismos quando expostos a determinada condição em função do tempo de exposição (Tarlak et al., 2018). O modelo de Baranyi e Roberts é um dos mais utilizados para prever o crescimento de microrganismos, visto que este inclui a fase exponencial e lag determinados por função ajuste. Dentre as fases de crescimento microbiano, tem-se atenção voltada à fase lag, uma vez que nesta fase ocorre a adaptação dos microrganismos ao ambiente com as condições estudadas, como exemplo pH e temperatura, e assim é possível determinar as melhores condições para ser mantida a qualidade dos produtos durante a vida de prateleira. A velocidade máxima de crescimento ou inibição do microrganismo é também outro parâmetro determinado pelo modelo de suma importância para avaliar o comportamento do mesmo dentro das condições ambientais propostas (Vercammen et al., 2017).

Ao longo dos anos vários pesquisadores têm utilizado a microbiologia preditiva para avaliar o comportamento de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Aeromonas*, bactérias ácidos lácticas e Enterobacteriaceae frente à parâmetros tais como: pH, temperatura, atividade de água, ácido acético, ácido propiônico, cloreto de sódio, dióxido de carbono, dentre outros (Akkermans et al., 2018; Couvert et al., 2017; Nyhan et al., 2018; Gonçalves et al., 2017; Hoel et al., 2018; Iliadis et al., 2018). Alguns pesquisadores têm realizado estudos preditivos de inibição bacteriana utilizando extratos de plantas como antimicrobianos naturais, dentre eles pode-se citar Krishnan et al. (2015), os quais avaliaram o efeito de extratos de cravo da Índia, canela e

orégano no crescimento de bactérias ácidos lácticas e Enterobacteriaceae nas temperaturas 4, 10, 15 e 20°C, obtendo-se bons ajustes pelo modelo de Gompertz. Kavuncuoglu et al. (2018) utilizaram modelo matemático para prever o efeito inibitório de extrato aquoso de semente de noz frente às bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacea*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*, variando a concentração bacteriana e o tipo de extração. Trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o potencial de extratos etanólicos da casca e de sementes de tamarindo para a inibição das bactérias *Bacillus subtilis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis (BR1020170013685). Devido a este fato e considerando a demanda cada vez mais crescente pela busca de antimicrobianos naturais, este trabalho objetivou avaliar o efeito do pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio e concentrações dos extratos de casca e de sementes de tamarindo no crescimento in vitro de bactérias patogênicas comumente encontradas em alimentos.

2. Metodologia

O presente artigo trata-se de uma pesquisa explicativa quantitativa (Pereira et al., 2018) desenvolvida pelo primeiro autor na dissertação de mestrado sob a orientação do terceiro autor. Neste estudo diferentes condições de pH, temperatura, concentração de NaCl e de extratos de resíduos de tamarindo foram avaliados frente a cinco bactérias patogênicas encontradas comumente em alimentos.

Vários pesquisadores como é o caso de Schlei et al.(2018) Akkermans et al. (2018), Couvert et al. (2017), Nyhan et al. (2018), Gonçalves et al. (2017), Hoel et al. (2018), Iliadis et al. (2018) tratam do estudo da microbiologia preditiva, onde se pode prever o comportamento de microrganismos frente a diferentes condições que podem ser encontradas em diferentes tipos de alimentos. A seguir serão apresentadas as metodologias experimentais utilizadas para no desenvolvimento do trabalho.

2.1. Bactérias

Pseudomonas aeruginosa (CBAM 0679) foi adquirida da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane, Coleção de bactérias da Amazônia (CBAM) (Fiocruz, Manaus, Amazônia), *Bacillus subtilis* (INCQS 00002), *Staphylococcus aureus* (INCQS

00014), *Salmonella* Enteritidis (INCQS 00258) e *Enterococcus faecalis* (INCQS 00531) foram fornecidas pela coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz (Manguinhos, Rio de Janeiro). As estirpes foram armazenadas em caldo de infusão de cérebro coração (BHI) e solução de glicerol a 20% a - 80°C em um *Ultrafreezer*.

2.2. Preparo e obtenção dos extratos de tamarindo

Os frutos de tamarindo foram adquiridos no mercado local da cidade de Guanambi, Bahia. Os frutos foram lavados com água potável corrente e sanitizados com hipoclorito de sódio a 200 mg/mL, por 15 min, e deixados secar à temperatura ambiente. As cascas e sementes foram manualmente separadas da polpa, pesadas e submetidas à secagem a 50°C em estufa por 24 h. Após esse período, cada resíduo, separadamente, foi triturado em moinho de facas (Technal® Tipo Willye), até a obtenção de um pó.

Em seguida, em frascos Erlenmeyers adicionou-se 5 g de cada resíduo separadamente (casca e semente) e 25 mL do solvente etanol a 80%. Os frascos foram mantidos sob agitação em shaker orbital a 200 rpm, durante 1 h a 30°C (Santos et al., 2019; Rodrigues et al., 2020). Após esse período, o material foi filtrado em papel filtro obtendo-se o sobrenadante e rotaevaporado a 40°C e 50 rpm em rotaevaporador (Fisatom, modelo-208).

2.3. Preparo das suspensões bacterianas

Uma alçada de cada cepa bacteriana foi adicionada a tubos contendo caldo BHI e posteriormente incubada a 37°C por 24 h. Em seguida 10 µL foi espalhado em ágar BHI e incubado à 37°C por 24 h. Uma colônia foi transferida para 20 mL de caldo BHI e novamente incubada a 37°C por 9h. Após este tempo, 20 µL da suspensão foi adicionada à 20 mL de caldo BHI mantendo-se à 37°C por 17 h (Nyhan et al., 2018; Akkermans et al., 2018). Por fim, foi feita a inoculação dos microrganismos repicados com o auxílio de uma alça de platina, em tubos contendo 10 mL de caldo BHI, a fim de se obter turbidez igual a escala 0,5 de Mc Farland, correspondente à concentração inicial de 10⁵ a 10⁶ cel/mL. A turbidez, como considera CLSI (2015), com a escala de McFarland foi comparada por turbidimetria em espectrofotômetro e em seguida fez-se diluições das suspensões, inoculou-se em ágar Mueller-Hinton e incubou-se por 24 h. Após este tempo, as colônias foram contadas para a confirmação da concentração inicial das suspensões bacterianas.

2.4. Crescimento de bactérias patogênicas em diferentes condições de cultivo

O crescimento das bactérias patogênicas foi avaliado em meio de cultivo contendo diferentes pHs, concentração de NaCL, concentração de extrato da casca ou da semente de tamarindo e incubação em diferentes temperaturas de acordo com o planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais descrito na Tabela 1, o qual foi baseado na metodologia descrita por Rodrigues & Iemma (2009). Para a realização de cada experimento, em tubos de experimento adicionou-se 10 mL de caldo BHI contendo as porcentagens de NaCL e extrato de resíduo de tamarindo (casca ou semente). O pH do meio foi ajustado utilizando-se solução de hidróxido de sódio 1N ou ácido clorídrico 1N. Em seguida adicionou-se ao meio 100 μ L do inóculo na concentração de 10^5 e 10^6 UFC/mL. Os tubos foram incubados nas temperaturas sugeridas durante 7h. A cada hora, removeu-se um tubo, realizou-se diluições seriadas e espalhou-se na superfície de ágar Mueller Hilton solidificado em placas de petri, através da técnica de plaqueamento por microgotas. Em seguida, as placas foram incubadas à 37° C durante 24 h em estufa BOD. Após este tempo, realizou-se as contagens das colônias e os resultados foram expressos em Log UFC/mL (Iliadis et al., 2018 com modificações) (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis reais e codificadas do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais.

Experimento	Temperatura	pH	Cloreto de Sódio (%)	Extrato casca ou semente (%)
1	(-1) 10,0	(-1) 5,0	(-1) 0	(-1) 0
2	(+1) 45,0	(-1) 5,0	(-1) 0	(+1) 10
3	(-1) 10,0	(+1) 9,0	(-1) 0	(+1) 10
4	(+1) 45,0	(+1) 9,0	(-1) 0	(-1) 0
5	(-1) 10,0	(-1) 5,0	(+1) 8,5	(+1) 10
6	(+1) 45,0	(-1) 5,0	(+1) 8,5	(-1) 0
7	(-1) 10,0	(+1) 9,0	(+1) 8,5	(-1) 0
8	(+1) 45,0	(+1) 9,0	(+1) 8,5	(+1) 10
9	(0) 28,0	(0) 7,0	(0) 4,3	(0) 5
10	(0) 28,0	(0) 7,0	(0) 4,3	(0) 5
11	(0) 28,0	(0) 7,0	(0) 4,3	(0) 5

Fonte: Autoras.

2.5 Obtenção dos parâmetros de crescimento microbiano

A partir dos resultados obtidos no item 2.4 utilizou-se o modelo primário de Baranyi e Roberts (1994) disponível no site ComBase (www.combase.cc) com auxílio do aplicativo DMFit 3.0, para determinar a velocidade máxima de crescimento/inibição (μ_{\max}) e o tempo da fase lag (λ) de cada bacteriana testada em cada experimento.

2.6 Análise estatística

O efeito dos parâmetros pH, temperatura, NaCL e extrato dos resíduos de tamarindo na velocidade máxima de crescimento/inibição de cada bactéria foi avaliado pelo programa Statistic 8.0 utilizando modelo padrão experimental 2^{k-p} de Box, Hunter e Hunter, o qual analisa planejamentos estatísticos fatoriais.

Todas as metodologias citadas acima foram baseadas em estudos prévios realizados por outros pesquisadores e algumas referidas como “com modificações” tiveram proporções ou volumes de soluções alterados para melhor se adequarem às condições experimentais do presente estudo.

3. Resultados e Discussão

3.1 Parâmetros do crescimento bacteriano em meio de cultivo contendo extrato de casca de tamarindo

A velocidade máxima de crescimento e o tempo da fase lag de cinco bactérias patogênicas em diferentes condições de pH, temperatura, NaCL e extrato etanólico de casca de tamarindo foram determinados segundo o modelo de Baranyi obtendo-se coeficientes de correlação que variaram entre 0,82 e 0,98 (Tabela 2).

Todas as bactérias demonstraram crescimento apenas na condição do experimento 4 (temperatura 45°C, pH 9,0, 0,0% NaCL e 0,0% de extrato), ou seja na ausência de NaCL e extrato da casca de tamarindo. Nas demais condições experimentais houve diminuição do crescimento bacteriano, ou seja, inibição ao longo do tempo de incubação.

B. subtilis foi a bactéria que não demonstrou tempo de fase lag para maioria das condições, com exceção das 4 e 7. Como também para a maioria das condições, houve inibição do crescimento isto significou que esta bactéria foi a mais sensível aos parâmetros. *S.*

Enteritidis também apresentou tempo de fase lag somente para as condições 3, 4 e 6. O maior tempo da fase lag (5,88) foi obtido por *E. faecalis* na condição 4, seguido pelo crescimento desta bactéria.

As maiores taxas de inibição para *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram obtidas na triplicata dos experimentos 9, 10 e 11 (28°C, pH 7,0, 4,3% NaCL e 5,0% de extrato de casca de tamarindo) com valores entre -0,27 e -6,04 Log UFC/mL h. Adelskov & Patel (2016) relataram que *B. subtilis* tem faixa de crescimento entre 24 e 50°C e crescimento ótimo em pH 7,0.

No presente trabalho, mesmo dentro das condições ótimas de pH e temperatura para o crescimento desta bactéria, a maior inibição observada nos experimentos 9, 10 e 11 pode ser devido a presença do cloreto de sódio e do extrato da casca de tamarindo. Também Santos e Santana (2016) ao estudarem o efeito antimicrobiano de extrato etanoico de casca de tamarindo relataram a sensibilidade desta bactéria ao extrato testado. Confirmando assim, a ação destes dois parâmetros como promotores da redução do crescimento do *B. subtilis*. Rubab et al. (2018) têm relatado que *S. aureus* é capaz de sobreviver a elevadas temperaturas e concentrações salinas.

Considerando também que a temperatura e o pH das condições 9, 10 e 11 são favoráveis ao crescimento da maioria das bactérias, a maior taxa de inibição desta bactéria nestas condições pode ter sido influenciada primariamente pelo extrato da casca de tamarindo (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4+1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Temperatura (°C)	pH	NaCL (%)	ECT (%)	λ (h)	$\mu_{\text{máx}}$ (Log UFC/mL h)	R ²
<i>B. subtilis</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,33	0,93
	2	45	5,0	0	10	0	-0,25	0,86
	3	10	9,0	0	10	0	-0,05	0,85
	4	45	9,0	0	0	3,0	0,38	0,92
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,37	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,19	0,93
	7	10	9,0	8,5	0	3,5	-0,14	0,95
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,24	0,98
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,46	0,97
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,44	0,97
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,39	0,93
<i>P. aeruginosa</i>	1	10	5,0	0	0	4,51	-0,42	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,23	0,93
	3	10	9,0	0	10	4,81	-1,11	0,97
	4	45	9,0	0	0	0	0,05	0,88
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,38	0,91
	6	45	5,0	8,5	0	3,69	-0,23	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,04	0,90
	8	45	9,0	8,5	10	1,49	-0,48	0,98
	9	28	7,0	4,3	5	2,77	-6,04	0,95
	10	28	7,0	4,3	5	2,76	-5,34	0,93
	11	28	7,0	4,3	5	2,76	-5,27	0,98
<i>E. faecalis</i>	1	10	5,0	0	0	2,37	-0,68	0,97
	2	45	5,0	0	10	3,29	-0,60	0,94
	3	10	9,0	0	10	0	-0,30	0,83
	4	45	9,0	0	0	5,88	0,84	0,90
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,32	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	2,64	-0,18	0,97
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,05	0,93
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,32	0,97
	9	28	7,0	4,3	5	1,57	-0,44	0,98
	10	28	7,0	4,3	5	1,99	-0,45	0,96
	11	28	7,0	4,3	5	2,07	-0,46	0,96

λ = tempo da fase lag; $\mu_{\text{máx}}$ = taxa de crescimento máximo; R² =coeficiente de correlação. ECT = extrato de casca de tamarindo em etanol 80%. Fonte: Autoras.

Já para *E. faecalis* e *S. Enteritidis* as maiores taxas de inibição foram obtidas na condição 1 (10°C, pH 5,0, 0,0% NaCL e 0,0% de extrato) e 3 (10°C, pH 9,0, 0,0% NaCL e 10,0% de extrato), respectivamente. *E. faecalis* tem demonstrado resistência a pHs entre 2,0 e 10,0 (Yang et al., 2019), outros fatores podem ser ponderados.

Portanto a maior taxa de inibição desta bactéria na condição 1 foi provavelmente devido à baixa temperatura utilizada. Em relação à *S. Enteritidis*, cuja temperatura de crescimento pode variar de 5 a 45°C, com ótimo de 37°C e pH entre 4,0 e 9,0, com ótimo de 7,0 (ICMSF, 1996), a maior taxa de inibição obtida na condição do experimento 3 pode ser atribuída à presença de 10,0% do extrato da casca de tamarindo (Tabela 2).

Continuação da Tabela 2. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Temperatura (°C)	pH	NaCL (%)	ECT (%)	λ (h)	μ_{\max} (Log UFC/mL h)	R ²
<i>S. aureus</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,31	0,82
	2	45	5,0	0	10	0	-0,26	0,94
	3	10	9,0	0	10	1,91	-1,06	0,95
	4	45	9,0	0	0	1,92	0,44	0,95
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,24	0,94
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,08	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	2,05	-0,09	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,21	0,85
	9	28	7,0	4,3	5	1,87	-0,40	0,96
	10	28	7,0	4,3	5	1,26	-0,29	0,97
	11	28	7,0	4,3	5	1,50	-0,27	0,91
<i>S. Enteritidis</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,36	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,32	0,96
	3	10	9,0	0	10	4,86	-1,09	0,97
	4	45	9,0	0	0	3,78	0,85	0,98
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,35	0,94
	6	45	5,0	8,5	0	1,61	-0,13	0,98
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,12	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,30	0,91
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,36	0,97
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,22	0,90
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,24	0,89

λ = tempo da fase lag; μ_{\max} = taxa de crescimento máximo; R² =coeficiente de correlação. ECT = extrato de casca de tamarindo em etanol 80%.

3.2. Parâmetros do crescimento bacteriano em meio de cultivo contendo extrato de sementes de tamarindo

A velocidade máxima de crescimento e o tempo da fase lag das bactérias patogênicas foram também determinados nas diferentes condições de pH, temperatura, NaCL e extrato etanólico de sementes de tamarindo utilizando o modelo de Baranyi e Roberts, obtendo-se

coeficientes de correlação que variaram entre 0,72 e 1,00 (Tabela 3). Isto significou que o modelo foi bem ajustado aos dados experimentais.

Também como observado nos experimentos anteriores com o extrato da casca de tamarindo, apenas na condição 4 (temperatura 45°C, pH 9,0, 0,0% NaCL e 0,0% de extrato de sementes de tamarindo) houve crescimento de todas as bactérias ao longo do tempo de incubação. Com exceção do *B. subtilis* e da *S. Enteritidis*, todos os microrganismos apresentaram fase lag nos experimentos 9, 10 e 11 (temperatura 28°C, pH 7,0, 4,3% NaCL e 5,0% de extrato de semente de tamarindo). *B. subtilis* e *S. Enteritidis* também não demonstraram tempo de fase lag para a maioria das condições. O maior tempo de fase lag (5,88 h) foi obtido para *E. faecalis*, no experimento 4 (45°C, pH 9,0), onde houve crescimento bacteriano. Segundo Aguirre et al. (2011) quando o microrganismo está exposto a um meio estressante e as condições não são favoráveis para o crescimento, como estratégia de sobrevivência, há um tendência de aumento da fase lag para adaptação ao meio.

Diferentemente dos resultados anteriores utilizando extrato da casca de tamarindo, as maiores taxas de inibição para *B. subtilis*, *S. Enteritidis* e *E. faecalis* foram obtidas na condição 1 (10°C e pH 5,0, 0,0% NaCL e 0,0% extrato). Este resultado significou que a concentração de cloreto de sódio e de extrato de sementes de tamarindo não foram determinantes para a inibição destas bactérias. Enquanto que para *P. aeruginosa* e *S. aureus* maior inibição foi obtido nas condições 2 (10°C, pH 9,0, 0,0% NaCL e 10% extrato de semente de tamarindo) e 8 (45°C, pH 9,0, 8,5% NaCL e 10% extrato de semente de tamarindo), respectivamente. *P. aeruginosa* possui a capacidade de adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos (Koneman et al., 2001), possui temperatura ótima de crescimento de 37°C e a maior parte dos sorotipos não cresce em meios ácidos (pH inferior a 4,5) (Palleroni, 2009).

Santos & Santana (2016) também relataram a sensibilidade da *P. aeruginosa* à extratos etanoicos de tamarindo. Portanto, a combinação de temperatura, pH e extrato de sementes de tamarindo contribuiu para a maior inibição desta bactéria na condição 2 do presente trabalho. *S. aureus* tem a capacidade de sobreviver em condições elevadas de temperatura elevadas e concentração de cloreto de sódio (Rubab et al., 2018). Contudo, a maior taxa de inibição desta bactéria na condição 8 pode ter sido fortemente influenciada pela presença da maior concentração do extrato de sementes de tamarindo. Pesquisadores também tem relatado a sensibilidade desta bactéria a extrato de semente de tamarindo (Santos e Santana, 2016) (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	EST (%)	λ (h)	$\mu_{\text{máx}}$ (Log UFC/mL h)	R ²
<i>B. subtilis</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,33	0,93
	2	45	5,0	0	10	3,0	-0,29	0,93
	3	10	9,0	0	10	0	-0,09	0,89
	4	45	9,0	0	0	3,0	0,38	0,92
	5	10	5,0	8,5	10	3,8	-0,20	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,19	0,93
	7	10	9,0	8,5	0	3,5	-0,14	0,95
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,03	0,87
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,16	0,95
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,16	0,85
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,25	0,93
<i>P. aeruginosa</i>	1	10	5,0	0	0	4,51	-0,42	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,19	0,72
	3	10	9,0	0	10	2,36	-0,14	0,96
	4	45	9,0	0	0	0	0,05	0,88
	5	10	5,0	8,5	10	3,33	-0,22	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	3,69	-0,23	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,04	0,90
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,11	0,97
	9	28	7,0	4,3	5	2,33	-0,13	0,90
	10	28	7,0	4,3	5	2,34	-0,16	0,98
	11	28	7,0	4,3	5	3,36	-0,27	0,98
<i>E. faecalis</i>	1	10	5,0	0	0	2,37	-0,68	0,97
	2	45	5,0	0	10	0,25	-0,67	1,00
	3	10	9,0	0	10	0	-0,09	0,88
	4	45	9,0	0	0	5,88	0,84	0,90
	5	10	5,0	8,5	10	3,94	-0,30	0,91
	6	45	5,0	8,5	0	2,64	-0,18	0,97
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,05	0,93
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,08	0,92
	9	28	7,0	4,3	5	4,07	-0,15	0,93
	10	28	7,0	4,3	5	3,70	-0,13	0,94
	11	28	7,0	4,3	5	4,0	-0,15	0,92

λ = tempo da fase lag; $\mu_{\text{máx}}$ = taxa de crescimento máximo; R² =coeficiente de correlação. EST = extrato de sementes de tamarindo em etanol 80%.

Continuação da Tabela 3. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

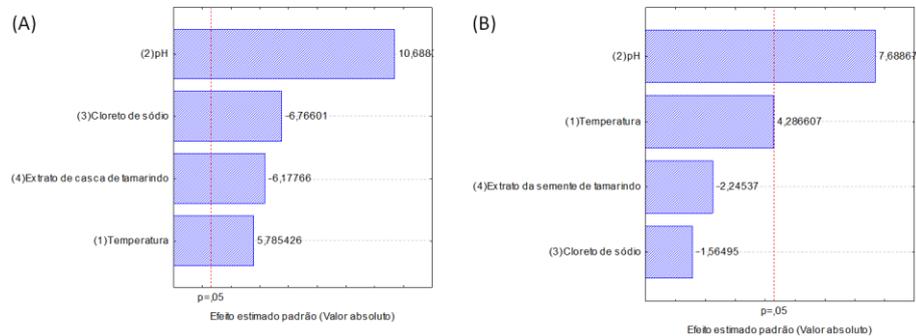
Bactérias	Experimento	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	EST (%)	λ (h)	μ_{\max} (Log UFC/mL h)	R ²
<i>S. aureus</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,31	0,82
	2	45	5,0	0	10	4,72	-0,82	0,92
	3	10	9,0	0	10	0	-0,09	0,89
	4	45	9,0	0	0	1,92	0,44	0,95
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,08	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,08	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	2,05	-0,09	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,45	0,95
	9	28	7,0	4,3	5	3,34	-0,19	0,94
	10	28	7,0	4,3	5	3,70	-0,13	0,94
	11	28	7,0	4,3	5	3,50	-0,12	0,98
<i>S. Enteritidis</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,36	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,19	0,80
	3	10	9,0	0	10	0	-0,08	0,78
	4	45	9,0	0	0	3,78	0,85	0,98
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,17	0,90
	6	45	5,0	8,5	0	1,61	-0,13	0,98
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,12	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	2,2	-0,06	0,86
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,12	0,99
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,14	0,92
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,10	0,98

λ = tempo da fase lag; μ_{\max} = taxa de crescimento máximo; R² =coeficiente de correlação. EST = extrato de sementes de tamarindo em etanol 80%.

3.3. Influência dos parâmetros no crescimento das bactérias patogênicas

O efeito do pH, NaCL, temperatura e extrato da casca ou de sementes de tamarindo sobre a velocidade máxima de crescimento bacteriano foi avaliado estatisticamente através dos diagramas de Pareto demonstrados a seguir. Quando a barra do pareto ultrapassa o lado direito da linha vermelha pontilhada do gráfico significa que o parâmetro influencia estatisticamente a um nível de 5% de significância (Fig. 1).

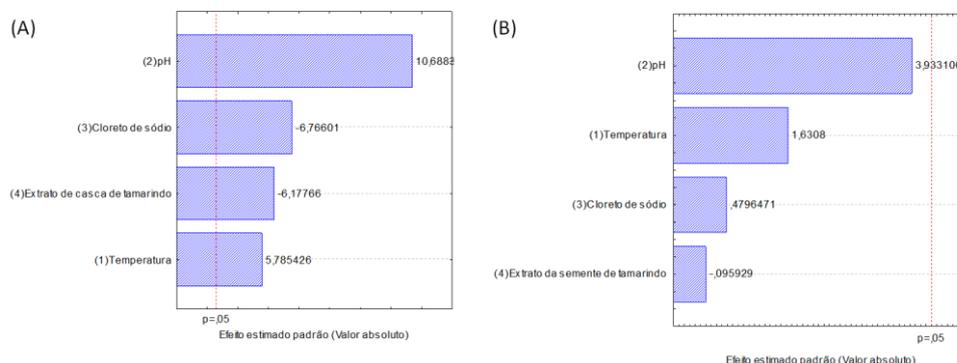
Figura 1. Diagrama de Pareto dos efeitos (A) da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo e (B) da temperatura, pH, NaCl e extrato das sementes de tamarindo na velocidade de crescimento do *B. subtilis*.



Fonte: Autoras.

Para *B. subtilis* (Fig. 1A) observou-se que quando utilizado o extrato de casca de tamarindo, todos os parâmetros influenciaram a velocidade de inibição do crescimento sendo o pH o parâmetro que mais influenciou e de forma positiva, ou seja, quanto maior o pH maior a taxa de inibição desta bactéria. Já no meio contendo extrato de semente de tamarindo apenas o pH influenciou a taxa de inibição desta bactéria, sendo também quanto maior o pH maior a taxa de inibição (Fig. 1B). A taxa de inibição de *P. aeruginosa* (Fig. 2) foi influenciada por todos os parâmetros quando utilizado o meio contendo extrato da casca de tamarindo, sendo também o pH o que mais influenciou, quanto maior o pH maior a taxa de inibição.

Figura 2. Diagrama de Pareto dos efeitos (A) da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo e (B) da temperatura, pH, NaCl e extrato das sementes de tamarindo na velocidade de crescimento do *P. aeruginosa*.



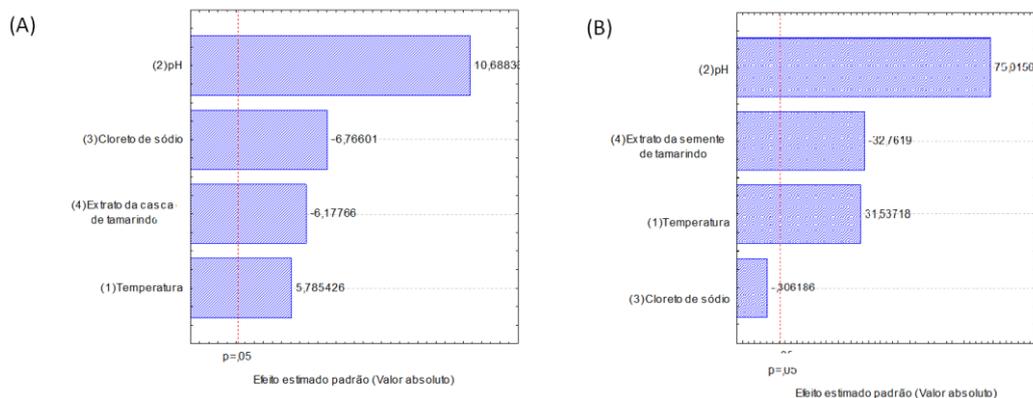
Fonte: Autoras.

O extrato da casca teve um efeito negativo, quanto maior a concentração menor a taxa de inibição. Já com o meio contendo o extrato de sementes nenhum parâmetro

significativamente influenciou a taxa de inibição desta bactéria. Gonçalves et al. (2017) também verificaram que o pH foi o parâmetro que mais influenciou para inibição do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em caldo de carne, sendo quanto menor o pH menores os valores de taxa máxima de crescimento.

Para a bactéria *E. faecalis* (Fig. 3) no meio com extrato de casca, todos os parâmetros influenciaram a taxa de crescimento e com o meio contendo extrato de sementes, exceto o cloreto de sódio não influenciou a taxa de inibição. Para ambos, o pH foi o parâmetro determinante para a inibição.

Figura 3. Diagrama de Pareto dos efeitos (A) da temperatura, pH, NaCL e extrato de casca de tamarindo e (B) da temperatura, pH, NaCL e extrato das sementes de tamarindo na velocidade de crescimento do *E. faecalis*.

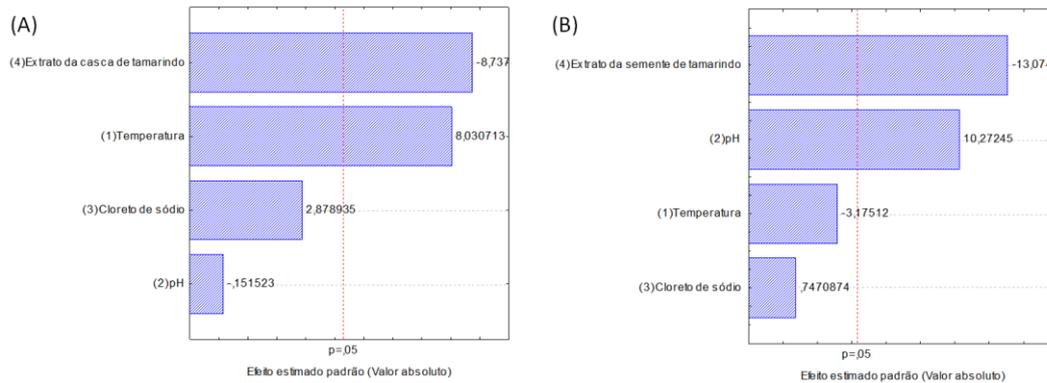


Fonte: Autores.

Para esta bactéria os extratos tiveram efeito negativo, ou seja, quanto maior a concentração dos mesmos menor a taxa de inibição. Este resultado foi similar aos anteriores onde a maior taxa de inibição foi obtida para esta bactéria nas condições em que não houve a presença dos extratos.

No caso do *S. aureus* (Fig. 4), o extrato de casca e de semente de tamarindo foram os parâmetros que mais influenciaram a taxa de inibição. Sendo quanto menor a concentração do extrato maior a taxa de inibição (efeito negativo). O efeito sinérgico do extrato de casca com a temperatura e o do extrato de semente com o pH contribuíram para a inibição desta bactéria.

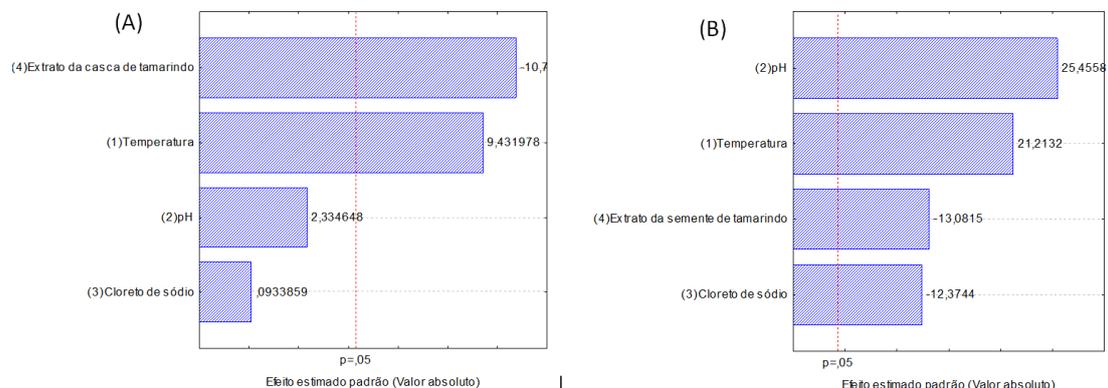
Figura 4. Diagrama de Pareto dos efeitos (A) da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo e (B) da temperatura, pH, NaCl e extrato das sementes de tamarindo na velocidade de crescimento do *S. aureus*.



Fonte: Autores.

A taxa de inibição de *S. Enteritidis* foi pelo extrato de casca de tamarindo e temperatura, sendo quanto menor a concentração de extrato (efeito negativo) e maior a temperatura (efeito positivo) maior a velocidade de inibição (Fig. 5A). Já quando utilizado meio contendo extrato de casca, todos os parâmetros foram significativos para a inibição, porém o pH foi o que mais influenciou, sendo a maior a taxa quanto maior o valor do pH (efeito positivo) (Fig. 5B).

Figura 5. Diagrama de Pareto dos efeitos (A) da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo e (B) da temperatura, pH, NaCl e extrato das sementes de tamarindo na velocidade de crescimento do *S. Enteritidis*.



Fonte: Autores.

Os resultados demonstrados foram satisfatórios, de forma inédita foi avaliado o efeito de pH, temperatura, concentração de NaCl e concentrações de extratos de casca ou de

sementes de tamarindo no crescimento de bactérias patogênicas. Os parâmetros em associação inibiram o crescimento destas bactérias e foi possível verificar qual o parâmetro que mais influenciou a inibição das mesmas. A contribuição dos extratos para o efeito inibitório foi estatisticamente significativa, sobretudo para a inibição de *S. aureus* e *S. Enteritidis*, demonstrando potencial dos mesmos para aplicação em trabalhos futuros como antimicrobianos naturais em sistemas de alimentos.

4. Conclusões

Nesta pesquisa avaliou-se o efeito do pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio e concentração de extrato etanólico de casca ou de sementes de tamarindo no crescimento das bactérias *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. Enteritidis*.

O modelo de Baranyi e Roberts foi bem ajustado aos dados experimentais (coeficientes de correlação entre 0,72 e 1,00). Para todas as condições utilizadas (exceto em temperatura 45°C, pH 9,0, 0,0% NaCl e 0,0% de extrato) houve inibição do crescimento bacteriano.

Através da análise estatística dos resultados verificou-se que quando utilizado o extrato da casca, a maioria dos parâmetros influenciou a taxa de inibição das bactérias, com destaque para o pH como o mais significativo.

Tanto o extrato de casca como de semente de tamarindo foram os parâmetros que mais influenciaram a taxa de inibição de *S. Enteritidis*. Este estudo nos permite avaliar de forma preditiva o comportamento destas bactérias patogênicas frente a condições adversas de pH, temperatura e concentrações de compostos, com o intuito de facilitar uma futura análise em sistemas de alimentos. O extrato de casca e sementes de tamarindo demonstrou potencial para ser usado em estudos futuros como antimicrobianos naturais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de Mestrado concedida ao primeiro autor.

Referências

Adelskov, J., Patel, B.K.C. (2016) A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis*

using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies stecoris strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor. *3 Biotech*, 6, 1–16.

Aguirre, J.S., Rodríguez, M. R., & Fernando, G.D.G. (2011) Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 236-246.

Akkermans, S., Nimmegeers, P., & Impe, J.F. (2018) A tutorial on uncertainty propagation techniques for predictive microbiology models: A critical analysis of state-of-the-art techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 282, 1-8.

BR1020170013685- Potencial antimicrobiano de extratos de resíduos de frutas exóticas (tamarindo (*Tamarindus indica*), granadilla (*Passiflora ligularis*), noni (*Morinda citrifolia*), dekopon (*Citrus reticulata* 'Shiranui'), sapoti (*Manilkara zapota*), tamarillo (*Solanum betaceum*) e mirtilo (*Vaccinium myrtillus*)), patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual em 23/01/2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard- Twelfth Edition*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Couvert, O., Guegan, S., Hezard, B., Huchet, V., Lintz, A., Thuault, D., & Stahl, V. (2017) Modeling carbon dioxide effect in a controlled atmosphere and its interactions with temperature and pH on the growth of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. *Food Microbiology*, 68, 89-96.

Gonçalves, L.D.A., Picolli, R.H., Peres, A.P., & Saúde, A.V. (2017) Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48 (2), 352-358.

Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2018) Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 285, p. 1-6.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996) *Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens*. London: Blackie Academic and Professional.

Iliadis, I., Daskalopoulou, A., Simões, M., & Giaouris, E. (2018) Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by *Salmonella enterica* ser. *enteritidis* and *typhimurium* under low nutrient food-related conditions. *Food Research International*, 107, 10-18.

Juneja, V.K., Golden, C.E., Misha, A., & Harrison, M.A. (2019) Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 49–58.

Kavuncuoglu, H., Kavuncuoglu, E., Karatas, S.M., Osman, Benli, B., Sagdic, O., & Yalcin, H. (2018) Prediction of the antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) kernel aqueous extracts using artificial neural network and multiple linear regression. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 78-86.

Koneman, W.E., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., & Winn Jr., W.C. (2001) Bacilos Gram-Negativos não-fermentadores. In: Koneman, E.W. (Ed.) *Diagnóstico microbiológico - Texto e Atlas colorido*. Rio de Janeiro: Médica e Científica.

Krishnan, K.R., Babuskin, R., Babu, P.A.S., Sivarajan, M., & Sukumar, M. (2015) Evaluation and predictive modeling the effects of spice extracts on raw chicken meat stored at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 166, 29-37.

Nyhan, L., Begley, M., Mutel, A., Qu, Y., Johnson, N., & Callanan, M. (2018) Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. *Food Microbiology*, 74, 75-85.

Palleroni, N.J. (2009) *Pseudomonas*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.

Pereira, A.S., Shitsuka, D.M., Parreira, F.J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1. Acesso em: 21 Abril 2020.

Rodrigues, H.G.A, Siqueira, A.C.P., & Santana, L.C.L.A. (2020). Aplicação de revestimentos comestíveis à base de quitosana e fécula de mandioca incorporados com extrato da semente de tamarindo na conservação de goiabas. *Research, Society and Development*, 9 (6), e119963695, 1-25.

Rodrigues, M.I., & Iemma, A.F. (2009) *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor.

Rubab, M., Shahbaz, H.M., Olaimat, A.N., & Oh, D.-H. (2018) Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics*, 105, 49–57.

Santos, T.R.J., Barbosa, P.F., Antunes, H.G.R., Narain, N. & Santana, L.C.L.A. (2019) Granadilla seed extract as antimicrobial and bioactive compounds source: mathematical modelling of extraction conditions. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(2), 157-170.

Schlei, K.P. et al. (2018). Predictive microbiology: general aspects and tendencies. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, 10(1): 52-68.

Stringer, S.C., & Metris, A. (2018) Predicting bacterial behaviour in sous vide food. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 13, 117–128.

Tarlak, F., Ozdemir, M., & Melikoglu, M. (2018) Mathematical modelling of temperature effect on growth kinetics of *Pseudomonas* spp. on sliced mushroom (*Agaricus bisporus*). *International Journal of Food Microbiology*, 266, 274-281.

Teleken, J.T., Galvão, A.C., Robazza, & W.S. (2018) Use of modified Richards model to predict isothermal and non-isothermal microbial growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, p. 614-620, 2018.

Vercammen, D., Telen, D., Nimmegeers, P., Janssens, A., Akkermans, S., Fernandez, E.N., Logist, F., & Impe, J.V. (2017) Application of a dynamic metabolic flux algorithm during a temperature-induced lag phase. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 1-19.

Xie, X., Tan, T., Xu, A., Deng, K., Zeng, Y., & Huang, H. (2019) UV-induced peroxidase-like activity of gold nanoclusters for differentiating pathogenic bacteria and detection of enterotoxin with colorimetric readout. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 279, 289–297.

Yang, Q., Lu, Y., Zhang, M., Gong, Y., Li, Z., Tran, N.T., He, Y., Zhu, C., Lu, Y., Zhang, Y., & Li, S. (2019) Lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis* Y17 and *Pediococcus pentosaceus* G11, improved growth performance, and immunity of mud crab (*Scylla paramamosain*). *Fish and Shellfish Immunology*, 93, 135–143.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Larissa de Almeida Soares – 50%

Luciana Cristina Lins de Aquino Santana – 50%