

Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais sobre bactérias isoladas de degelo de peixe

***In vitro* antimicrobial activity of vegetable extracts on isolated fish thaw**

Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de vegetales en bacterias aisladas deshielo de pescado

Recebido: 07/08/2020 | Revisado: 08/08/2020 | Aceito: 13/08/2020 | Publicado: 20/08/2020

Isadora do Nascimento Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1866-3043>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: iza_oliveira18@hotmail.com

Amanda Mara Teles

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5068-4696>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: damarateles@hotmail.com

Geisa Correia Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9462-0291>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

Email: geisacorreia.sa@gmail.com

Catarina da Silva Saboia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6030-299X>

Universidade Federal do Maranhão

Email: catarinasilsa@hotmail.com

Bianca Araújo Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8096-7278>

Instituto Federal do Maranhão

Email: biancaaraujo57@hotmail.com

Danilo Torres Cardoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9551-7210>

Universidade Federal do Maranhão

E-mail: danilo_161196@hotmail.com

Adenilde Nascimento Mouchrek

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3270-1437>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: adenil@bol.com.br

Resumo

Este estudo objetivou-se determinar o rendimento, a prospecção fitoquímica, o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antimicrobiana promovida pelos extratos vegetais das partes aéreas *Origanum vulgare*, do rizoma *Curcuma longa* e *Zingiber officinale*, hidroetanólicos 70% obtidos no mercado central de São Luís – MA, Brasil. Os extratos foram produzidos a partir do processo de maceração no mês de junho de 2018. O rendimento em porcentagem foi determinado a partir do material in natura, a triagem fitoquímica dos extratos foi realizada através de métodos qualitativos colorimétricos e de precipitação. O conteúdo de fenólicos totais foi determinado através do método colorimétrico utilizando reagente de Folin-Ciocalteu. Para avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se isolados obtidos a partir do degelo do peixe. O rendimento foi de 20,03%, 26,32% e de 2,8%, e para conteúdo de fenólicos totais de 138,79; 250,95 e de 100,12 mg EAT 100 g⁻¹, respectivamente para *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale*. A triagem fitoquímica dos extratos exibiu a presença de positiva para fenóis, alcaloides, triterpenos, flavononas, flavonóis, catequinas, flavonoides e esteróides. A atividade de inibição antibacteriana apresentou bons resultados, expressos em concentração de inibição mínima CIM para os três extratos vegetais avaliados, em especial para *C. longa* que apresentou alta sensibilidade aos isolados bacterianos. Os resultados obtidos neste estudo apresentam os extratos de *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale* como possíveis agentes na extração de compostos fenólicos totais e como antibacteriano podendo ser empregados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de biotecnologia e agrícola.

Palavras-chave: Extratos vegetais; *Origanum vulgare*; *Curcuma longa*; *Zingiber officinale*; Compostos fenólicos.

Abstract

This study aimed to determine the yield, phytochemical prospecting, the content of total phenolic compounds and the antimicrobial activity promoted by the plant extracts from the aerial parts *Origanum vulgare* and the rhizome of *Curcuma longa* and *Zingiber officinale*, 70% hydroethanolic obtained in the Central Market of São Luís - MA, Brazil. Extracts were produced from the maceration process in June 2018. The percentage yield was determined from the raw material, the phytochemical screening of the extracts was performed using qualitative colorimetric and precipitation methods. The total phenolic content, was determined using the colorimetric method using the *Folin-Ciocalteu* reagent. To evaluate the antimicrobial activity, isolates obtained from the thaw of the fish were used.

The yield was 20.03%, 26.32% and 2.8%, and for a total phenolic content of 138.79; 250.95 and 100.12 mg EAT 100 g⁻¹, respectively for *O. vulgare*, *C. longa* and *Z. officinale*. The phytochemical screening of the extracts, showed the presence of positive for phenols, alkaloids, triterpenes, flavonones, flavonols, catechins, flavonoids and steroids. The antibacterial inhibition activity showed good results, expressed in minimum inhibition concentration MIC for the three plant extracts evaluated, especially for *C. longa*, which showed high sensitivity to bacterial isolates. The results obtained in this study, show the extracts of *O. vulgare*, *C. longa* and *Z. officinale* as possible agents in the extraction of total phenolic compounds and as antibacterial and can be used in the food, pharmaceutical, biotechnology and agricultural industries.

Keywords: Vegetable extracts; *Origanum vulgare*; *Curcuma longa*; *Zingiber officinale*; Phenolic compounds.

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo determinar el rendimiento, la prospección fitoquímica, el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antimicrobiana promovida por los extractos vegetales de las partes aéreas *Origanum vulgare* y el rizoma *Curcuma longa* y *Zingiber officinale*, hidroetanólicos 70% obtenidos en el Mercado Central de São Luís - MA, Brasil. Los extractos se produjeron a partir del proceso de maceración en el mes de junio de 2018. El rendimiento porcentual se determinó a partir de lamateria prima, el tamizaje fitoquímica de los extractos se realizó mediante métodos colorimétricos cualitativos y de precipitación. El contenido fenólico total se determinó mediante el método colorimétrico con el reactivo de *Folin-Ciocalteu*. Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizaron aislados obtenidos del deshielo del pescado. El rendimiento fue del 20,03%, 26,32% y 2,8%, y para un contenido fenólico total de 138,79; 250,95 y 100,12 mg EAT 100 g⁻¹, respectivamente para *O. vulgare*, *C. longa* y *Z. officinale*. El tamizaje fitoquímica de los extractos mostró la presencia positiva para fenoles, alcaloides, triterpenos, flavononas, flavonoles, catequinas, flavonoides y esteroides. La actividad de inhibición antibacteriana mostró buenos resultados, expresados en concentración mínima de inhibición de CMI para los tres extractos de plantas evaluadas, especialmente para *C. longa*, que mostró alta sensibilidad a los aislados bacterianos. Los resultados obtenidos en este estudio muestran los extractos de *O. vulgare*, *C. longa* y *Z. officinale* como posibles agentes en la extracción de compuestos fenólicos totales y como antibacterianos y, pueden ser utilizados en las industrias alimentaria, farmacéutica, biotecnológica y agrícola.

Palabras clave: Extractos vegetales; *Origanum vulgare*; *Curcuma longa*; *Zingiber officinale*; Compuestos fenólicos.

1. Introdução

Produtos vegetais são caracterizados como alternativa para fins nutricionais e fitoterapêuticos na prevenção e cura de doenças desde os tempos antigos. O uso terapêutico a base de vegetais vem despertando o interesse científico, para novos caminhos no controle e cura de diversas patologias e fitopatologias em nosso meio (Menezes Filho & Castro, 2019a; Souza, et al., 2017). Várias dessas espécies são comumente empregadas na indústria de alimentos. Os condimentos ou especiarias são utilizados no preparo de alimentos a fim de melhorar as características sensoriais e como agente conservante, por seu potencial antimicrobiano (Teixeira, et al., 2014).

A atividade antimicrobiana promovida a partir de especiarias utilizadas na indústria de alimentos possuem tais propriedades biológicas comprovadas, a exemplo disto a *Curcuma longa* (açafrão) (Oliveira, 2017), *Zingiber officinale* (gengibre) (Silva, 2018) e *Origanum vulgare* (orégano) apresentam ação bactericida para inúmeros gêneros de bactérias patogênicas (Porto & Rosa, 2018; Dutra, et al., 2018).

Estes produtos naturais possuem potencial antimicrobiano comprovado, e vários estudos descrevem a aplicação dos mesmos para prolongar a validade dos produtos alimentícios sem riscos ao consumidor ou interferência nas características naturais do alimento (Solórzano-Santos, et al., 2012; Tajkarimi, et al., 2010).

A busca para diminuir ou restringir o uso de antimicrobianos sintéticos, intensifica os estudos da Química Natural a fim de demonstrar as ações potenciais e promissoras desses compostos naturais (Solórzano-Santos et al., 2012; Andrade, et al., 2012; Miranda, 2016). Tal busca se baseia no grande risco de contaminação através dos alimentos, e o surgimento de potencial resistência promovido por bactérias aos antibióticos de referência, surgindo o interesse da adição de agentes antimicrobianos naturais em alimentos, como forma de mitigar os casos de doenças bacterianas transmitidas pelos alimentos (Atarés & Chiralt, 2016).

Essas doenças são assim, classificadas devido à má ingestão por pessoas a partir de alimentos contaminados por microrganismos ou toxinas produzidas por estes, mas há ainda as doenças por contaminação bacteriana que necessitam apenas de um caso notificado para ser categorizada como uma doença transmitida por alimentos (DTA), a exemplo, o gênero *Escherichia*, *Escherichia coli* (Oliveira, et al., 2010). Assim como bactérias isoladas a partir do degelo do peixe como *Serratia rubidala*, *Kluyvera georgiana*, *Raoultella terrigena* e *Escherichia vulneris* são importantes patógenos alimentares, estando dentre os maiores causadores de surtos bacterianos no Brasil.

O tratamento efetuado nestes casos ocasiona o uso indiscriminado de antibióticos. Estes têm proporcionado uma crescente resistência múltipla de microrganismos a drogas, gerando problemas de saúde pública devido aos resíduos destes nos alimentos (Souza, et al., 2017). Os antibióticos utilizados agem como uma importante pressão seletiva para o surgimento e persistência de cepas resistentes, inviabilizando assim, o uso de certa classe química (Gebreyes, et al., 2017).

Alternativas ao uso de agentes antimicrobianos e antifúngicos sintéticos têm sido propostas nos últimos anos, algumas abordagens incluem os produtos à base de plantas medicinais já conhecidas pela população do campo, bem como a procura por novos vegetais que apresentem compostos metabólitos secundários do processo fisiológico natural que apresentam classes fitoquímicas com alto potencial antimicrobiano (Menezes Filho, et al., 2019b; Oliveira, et al., 2010). Essa determinação promissora da ação de produtos naturais sobre os microrganismos, utilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas deve ser realizado devido ao seu baixo custo de aquisição, forma de uso e ação fitoterapêutica, como a viabilidade do potencial medicinal e seu emprego na indústria alimentícia, cosmética, agrícola, de biotecnologia e farmacêutica. Visto que, a resistência bacteriana é um dos mais significantes desafios para a saúde humana (Teles, et al., 2019a).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana em isolados bacterianos no degelo de peixe sobre a ação de extratos vegetais das partes aéreas *Origanum vulgare* (orégano), do rizoma de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Curcuma longa L.* (açafraão), assim como, determinar sua composição química e teor de compostos fenólicos totais.

2. Metodologia

A pesquisa foi realizada no ano de 2019 no laboratório de Microbiologia de Alimentos e Águas e Físico-Química de Alimentos e Águas do programa controle de qualidade de alimentos e águas do pavilhão tecnológico no Campus de São Luís da Universidade Federal do Maranhão - (UFMA).

2.1. Coleta do material vegetal

As partes aéreas e o rizoma sem ataque por insetos e clorose, foram coletadas em indivíduos de *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale* nas primeiras horas da manhã entre as 6-8 h

na área de produtos naturais da UFMA, campus de São Luís. O material vegetal foi encaminhado em seguida para o laboratório para produção dos extratos.

2.2. Preparo dos extratos hidroetanólicos de *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale*

Os extratos foram obtidos pelo processo de maceração, utilizando como solvente solução hidroetanólica 70% (v/v). Para o extrato hidroetanólico de *O. vulgare*(OV) foram utilizadas cerca de 200 g do pó das folhas secas e para *C. longa*(AF) e de *Z. officinale* (ZO) alíquotas de 200 g dos rizomas foram secos em estufa com circulação de ar forçada, e em seguida pesados. Transferiu-se o material vegetal para um recipiente adequado onde foram acrescidos 600 mL de solução hidroetanólica 70%, até completa submersão do material vegetal. O recipiente foi vedado e deixou-se em maceração por 7 dias à temperatura ambiente, em local ao abrigo da luz. Ao final do período, o material foi filtrado, primeiramente, sobre gaze e depois sobre papel de filtro qualitativo. Concentrou-se o filtrado em evaporador rotativo a pressão negativa para, depois, transferência para frasco apropriado, que foi levado à estufa de secagem de ar convectiva FANEM 520 a 45°C por 24 horas, para completa secagem do extrato. Depois de secos, os extratos tiveram suas massas aferidas para posterior cálculo de rendimento.

O rendimento do extrato foi expresso em % em relação (massa/massa), pelo peso da planta in natura e da massa obtida do extrato pronto.

2.3. Prospecção fitoquímica dos extratos

Os extratos foram submetidos a testes químicos qualitativos baseados na metodologia apresentada por Menezes Filho e Castro (2020), e Matos (2009), para detecção de fenóis e taninos (reação com cloreto férrico); antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas (variação de pH utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio); flavonóis, flavanonas, flavonóis e xantonas (reação com magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado). Os resultados obtidos em cada ensaio foram avaliados qualitativamente através de reações no desprendimento de colorações e na formação de precipitado. O teste de cruz foi adotado para determinação da (-) ausência ou (+) presença da classe fitoquímica avaliada, conforme (Menezes Filho & Castro, 2020).

2.4. Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais dos extratos vegetais de *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale* ocorreu através do método colorimétrico quantitativo de *Folin-Ciocalteu* (Waterhouse, 2012). Para a determinação da curva padrão expressa em ácido tânico, foi preparada uma solução de 2.000 µg mL⁻¹, a qual originou cinco diferentes diluições (10, 25, 50, 75, 100, 125 µg ácido tânico mL⁻¹). Em seguida, em tubos de ensaios, foram acrescentados 0,5 mL a cada solução diluída, com 2,5 mL da solução de *Folin-Ciocalteu* 10% (v/v), mais 2 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v) e 10 mL de água destilada. Sendo essa solução homogeneizada e deixa em descanso protegida da luz por 30 min., logo após, foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod. Q-898U2M5) a 760 nm, utilizando cubeta de quartzo de campo único de 1 cm. Os resultados da absorbância foram representados graficamente em função da concentração de ácido tânico, através da equação de regressão e respectivos coeficientes utilizando o programa Excel (versão paga, 2010).

O equipamento foi calibrado utilizando etanol (P.A – ACS) como branco instrumental. Os ensaios foram realizados em duplicata. O teor de fenólicos totais foi calculado utilizando a equação de regressão obtida com a partir da curva de ácido tânico, e com os valores da absorbância conforme equação 1.

$$FT = \frac{X_{FT}}{0,001} \quad \text{Eq. [1]}$$

Onde FT = teor de compostos fenólicos totais expressos em mg EAT g⁻¹; XFT = valor de “x” da equação de regressão obtida pela curva do ácido tânico.

2.5. Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos hidroetanólicos

Para determinação do potencial antimicrobiano foi aplicado ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), conforme descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute (2003), pela técnica de diluição em caldo de cérebro e coração (Kasvi - BHI).

Foram utilizadas treze cepas de bactérias provenientes do degelo de peixe doadas pelo laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Águas da Universidade Federal do Maranhão (PCQA-UFMA).

As culturas bacterianas mantidas em ágar triptona de soja (Kasvi - TSA) foram repicadas para solução de caldo de infusão de cérebro e coração BHI e incubadas a 35°C em estufa bacteriológica (FANEM, estufa de cultura 502, Mod. A-LT) até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril (Arboreto), de modo a se obter uma turbidez comparável à da solução padrão na escala McFarland de 0,5, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2003).

Primeiramente, foram preparadas soluções na concentração de 5.000 µg mL⁻¹ dos extratos hidroetanólicos 70%. As soluções foram preparadas utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, P.A – ACS) a 0,1%. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em caldo BHI, resultando nas concentrações entre 50 a 1.000 µg mL⁻¹. A suspensão microbiana contendo $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ das cepas isoladas de degelo de peixe, foram adicionadas a cada concentração em placa de *Petri* de 10 cm. Realizou-se como controle negativo constituído apenas da solução de DMSO e como controle positivo o antibiótico de referência gentamicina nas concentrações entre 128 a 0,015625 µg mL⁻¹ de acordo com as recomendações de Anhalt e Washington (1985). Foram reservados tubos para controle de esterilidade do caldo e de crescimento bacteriano. Logo após, os tubos foram incubados a 35°C por 24 hora sem estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, foi verificada a concentração inibitória mínima dos extratos, sendo definida como a menor concentração que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano (ausência de turvação visível). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6. Análise estatística

A partir dos resultados das médias seguidas de \pm desvio padrão à análise de variância (ANOVA) de um fator e quando esta análise apresentou variação significativa ($p < 0,05$) foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism (versão 7.0).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização físico-química dos extratos hidroetanólicos

O rendimento dos extratos vegetais hidroetanólicos obtidos para *O. vulgare* (orégano), *C. longa* (açafraão) e de *Z. officinale* (gengibre), estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento dos extratos vegetais hidroetanólicos obtidos pelo processo de maceração, para *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale*. Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (p<0,05).

| Espécie | Rendimento (%) (m/m) |
|----------------------|----------------------------|
| <i>O. vulgare</i> | 20,03 ^a ± 0,005 |
| <i>C. longa</i> | 26,32 ^b ± 0,01 |
| <i>Z. officinale</i> | 2,8 ^c ± 0,057 |

Fonte: Autores, (2020).

Foi realizado o teste Tukey's de múltipla comparação e verificamos que os extratos foram diferentes estatisticamente si, conforme a Tabela 1, o extrato de *C. longa* mostrou apresentar maior rendimento comparado aos demais, com percentual de 26%, seguido de *O. vulgare* com rendimento de 20%, e para *Z. officinale* com 2,8%.

O rendimento é considerado fator importante na produção de extratos, os quais baseados no método e tempo de extração (Oliveira, et al., 2012). Dessa forma, extratos com alto rendimento de produção agregam maior valor comercial associado ao custo-benefício e suas possíveis ações biológicas. Normalmente estes são sintetizados por técnicas de extração, como a maceração (Milillo, et al., 2011; Solórzano-Santos, et al., 2011) que se separam-se da água por diferença de densidade e de polaridade para o solvente avaliado.

Menezes Filho, et al., (2020), e Menezes Filho, et al., (2019), discutem em seus estudos sobre produção de extrato vegetal, que, os diferentes solventes, bem como o aumento da polaridade ocorre a extração de números variados de classes fitoquímicas, sendo necessário avaliar qual o melhor solvente a ser utilizado, como observado em análises de extração de compostos fenólicos totais e por cromatografia em camada delgada. Ainda, deve-se ressaltar

que mesmo um solvente consiga extrair um número considerado alto de compostos deve ser avaliado quanto ao seu grau de toxicidade.

Foi realizada ainda a triagem fitoquímica dos extratos hidroetanólicos onde apresentaram maior poder de extração para as classes de compostos do metabolismo secundário, onde se destacam fenóis, alcaloides, triterpenos, flavononas, flavonóis, xantonas, além de flavanonóis e esteróides como pode ser observado na (Tabela 2).

A composição química dos extratos mostrou a presença de diversas classes de metabólitos secundários que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas ativas em especial como agente antimicrobiano.

Tabela 2. Classes de metabólitos secundários identificados por técnicas qualitativas para os extratos de *O.vulgare*, *C. longa* e *Z.officinale*.

| | | Classes de Metabólitos | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| Extratos | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| OV | | + | - | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - |
| AF | | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + | - | - | - | - | + | - |
| ZO | | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | - |

Nota:1: Fenóis;2: Taninos;3: Alcaloides;4: Triterpenos;5: Cumarinas;6: Antocianinas;7: Antocianidinas;8: Flavononas;9: Flavonóis;10: Xantonas;11: Chalconas;12: Auronas;13: Leucoantocianidinas;14: Catequinas;15: Flavonóides; 16: Esteroides. Teste de cruz: (+): presença, e (-): ausência. OV: extrato de orégano; AF: extrato de açafraão; ZO: extrato de gengibre. Fonte: Autores, (2020).

Na Tabela 2, pode ser observado grande número de classes fitoquímicas a partir do metabolismo secundário dos vegetais analisados que apresentaram reação positiva para os ensaios avaliados, demonstrando que os extratos hidroetanólicos 70% apresenta alta efetividade na extração das classes fitoquímicas observadas.

De acordo com Menezes Filho e Castro, (2020), Schirato, et al., (2006), classes metabólicas secundárias como de ácidos orgânicos, cumarinas, fenóis, flavonoides e polissacarídeos apresentam intensa atividade antimicrobiana.

Existem diversos fatores que podem interferir no teor de metabólitos secundários em extratos vegetais, dos quais, os compostos fenólicos fazem parte. Dentre eles estão à temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, adição de nutrientes, poluição ambiental e ataque de patógenos, bem como, grupos de indivíduos vegetais e quimiotipos, dentre outros fatores intrínsecos e extrínsecos(Menezes Filho & Castro, 2019; Teles, et al., 2019b).

Diante das semelhanças das classes químicas presente nos extratos foi quantificado o teor de compostos fenólicos totais encontrados para *O. vulgare*, *C. longae* para *Z. officinale* como observado na (Tabela 3), calculados através da equação de regressão $y = 0,006x + 0,006$, com R^2 de (0,999).

Tabela 3. Teores de compostos fenólicos totais nos extratos vegetais de *O. vulgare*, *C. longae* para *Z. officinale*. Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (p<0,05).

| Extratos | Conteúdo de fenólicos totais (mg EAT 100 g ⁻¹)* |
|----------------------|---|
| <i>O. vulgare</i> | 138,79 ^a ± 0,010 |
| <i>C. longa</i> | 250,95 ^b ± 0,011 |
| <i>Z. officinale</i> | 100,12 ^c ± 0,017 |

*EAT = equivalente em ácido tânico. Fonte: Autores, (2020).

Os teores de fenólicos totais nos extratos de *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale*, foram de 138; 250 e 100 mg EAT g⁻¹ como observado na (Tabela 3), respectivamente. A análise do teor de compostos fenólicos totais surge do interesse em determinar e quantificar os compostos bioativos presentes no extrato. Essa análise utiliza o reagente de *Folin-Ciocalteu* que complexa com os compostos fenólicos do extrato, formando um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores (Veber, et al., 2015). Os compostos fenólicos totais apresentam diversas categorias como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoicos e cinâmico), cumarinas. Flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, naftoquinonas, antraquinonas, biflavonoides, lignanas e de ligninas (Burque, et al., 2015; Angelo & Jorge, 2007).

Algumas das classes químicas apresentadas na Tabela 2 são responsáveis pela ação antibacteriana, como citado anteriormente para esses condimentos, assim como compostos fenólicos, compostos voláteis carvacrol, linalol, timol, mentol, D-limoneno e eugenol. Incluindo também derivados terpênicos, diterpênicos, mono e sesquiterpenos e os fenilpropanoides (Teles, et al., 2019c).

3.2. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos

Os resultados para concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados na (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima dos extratos hidroetanólicos 70% de *O. vulgare*, *C. longa* e *Z. officinale* sobre bactérias isoladas do degelo de peixe.

| Bactérias ($1,5 \cdot 10^8$ UFCmL ⁻¹) | Concentração Inibitória Mínima CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)* | | | |
|---|---|--------------------------------|-------------------------------|-------------|
| | <i>Z. officinale</i> (gengibre) | <i>O. vulgare</i> (orégano) | <i>C. longa</i> (açafraão) | Gentamicina |
| <i>Kluyvera Pneumoniae</i> | 500 | 1000 | 250 | 0,5 |
| <i>Escherichia Coli</i> | 1000 | 750 | 500 | 1,0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 500 | 1000 | 1000 | 2,0 |
| <i>Serratia rubidala</i> | 1000 | 500 | 1000 | 2,0 |
| <i>Kluyvera georgiana</i> | 500 | 500 | 1000 | 1,0 |
| <i>Raoultella terrigena</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 2,0 |
| <i>Escherichia vulneris</i> | 250 | 500 | 1000 | 0,5 |
| <i>Kluyvera ascorbata</i> | 500 | 1000 | 250 | 0,5 |
| <i>Trabulsiellaguaminsis</i> | 500 | 1000 | 200 | 0,25 |
| <i>Hafniaalvei</i> | 500 | 1000 | 250 | 0,5 |
| <i>Kluyvera cryocescens</i> | 500 | 750 | 200 | 0,125 |
| <i>Serratia fonticola</i> | 250 | 500 | 200 | 0,25 |
| <i>Citrobacter farmeri</i> | 250 | 1000 | 1000 | 1,0 |

Fonte: Autores, (2020).

De acordo com Aligiannis, et al. (2001), sugerem uma classificação para esta atividade, definindo como forte os extratos brutos que possuem CIM até $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, moderada para CIM de 600 a $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e fraca para CIM acima de $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa forma, nenhum dos isolados bacterianos apresentados neste estudo, apresentaram perfil de sensibilidade fraco frente aos extratos avaliados (Tabela 4).

O extrato vegetal de *O. vulgare* demonstrou maior eficiência de inibição CIM, tanto para cepas Gram-positivas como Gram-negativas, corroborando com os estudos de

Stefanakis, et al., (2013), Sankar, et al., (2013), e Sarikurkcu, et al., (2015), onde os pesquisadores relataram atividades antimicrobianas para diferentes gêneros de bactérias utilizando extrato de *O. vulgare* com resultados próximos ao deste estudo. Já nos estudos de Soković, et al., (2010), os pesquisadores obtiveram CIM inferior ao deste estudo, em estudo avaliando algumas cepas bacterianas utilizando o extrato foliar de *O. vulgare*.

Para o extrato foliar de *C. longa*, as bactérias testadas apresentaram ser mais sensíveis, resultados estes, que corroboram com os estudos de Gupta, et al., (2015), e por Mishra, et al., (2018), avaliando cepas bacterianas com o extrato e suas frações de *C. longa*. O mesmo foi observado por Singh, et al., (2011), onde encontraram resultados satisfatórios de CIM no controle bacteriano, como estado neste estudo.

Em relação ao efeito bactericida promovido pelo extrato foliar de *Z. officinale*, os valores obtidos neste estudo, são superiores aos observados no trabalho de Singh, et al., (2008), sendo a mesma ocorrência relatada por Grégio, et al., (2006). Porém, os valores de CIM foram comprovados por Sasidharan e Menon (2010), que encontraram valores semelhantes.

Diante dos resultados foi possível afirmar que os extratos vegetais utilizados, possuem eficiência que implica no incentivo de seu uso como antimicrobiano natural como pode ser comprovado nos ensaios deste estudo.

4. Considerações Finais

Conclui-se que, os resultados obtidos neste estudo, apresentaram bons conteúdos de rendimento de extrato, várias classes fitoquímicas, alto conteúdo de compostos fenólicos totais e efetiva atividade antibacteriana *in vitro*. Os extratos produzidos a partir da solução hidroetanólica 70% apresentam ser fortes candidatos a novos ensaios antibacterianos, podendo ser também empregados nas indústrias de alimentos, biotecnologia, agrícola e farmacêutica visto que, apresentam riqueza de constituintes químicos de real importância.

Novos estudos poderão ser realizados avaliando os extratos vegetais incluídos durante a produção do gelo utilizado na conservação, e manutenção da temperatura em que os pescados necessitam estarem.

Referências

- Andrade, M.A., Cardoso, M.D.G., Batista, L.R., Mallet, A.C.T., & Machado, S.M.F. (2012). Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: Composition, antioxidant and antibacterial activities. *Revista Ciencia Agrônômica*. (43), 399–408.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1,1-9.
- Anhalt, J. P., & Washington II, J. A. (1985). Preparation and storage of antimicrobial solutions. In: Lennette, E. H., Balows, A., Hausler Jr., W. J. et al. (Ed.) Manual of clinical microbiology. *Washington: American Society for Microbiology*, 1019-1020.
- Atarés. L. & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in food science & technology*. (48). 51-62.
- Burque, R. K., Francesconi, L. P., Victorino, A. T., Mascarenhas, M. A., & Ceresér, K. M. . (2015). Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Lafoensia pacari* (*Lythraceae*). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 12, n. 1. P. 1-10.
- CLSI. (2015). & M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; *Approved Standard* - Twelfth Edition.
- Dutra, T. V., Castro, J. C., Menezes, J. L., Ramos, T. R., Do Prado, I. N., Júnior, M. M., & De Abreu Filho, B.A. (2019). Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus spp.* *Industrial Crops and Products*. 129:345-349.
- Gebreyes, W. A., Wittum, T.,& Habing, G. et al. Spread of Antibiotic Resistance in Food Animal Production Systems. In: Dodd, C., Aldsworth, T., Stein, R.A. et al. (Ed.). *Foodborne Diseases* (Third edition). *Cambridge: Academic Press*, (2017).105-130.

Grégio, A. M. T., Fortes, E. S. M., Rosa, E. A. R., Simeoni, R. B., & Rosa, R. T. (2006). Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. *Estudos de Biologia*. 28:61.

Gupta, A., Mahajan, S., & Sharma, R. (2015). Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology reports*. (6).51-55.

Matos, F. D. A. (1997). *Introdução à fitoquímica experimental*. edições UFC.

Menezes Filho, A. C. P. de., & Castro, C .F. de S. (2019a). Identificação das classes metabólicas secundárias em extratos etanólicos foliares de *Byrsonima verbascifolia*, *Cardiopetalum calophyllum*, *Curatella americana* e *Qualea grandiflora*. *Colloquium Agrariae*. 15 (4), 39-50.

Menezes Filho, A. C. P. de, Oliveira Filho, J. G., & Christofoli, M.,Castro, C.F. de S. (2019b). Atividade antioxidante e compostos bioativos em espécies de um fragmento de Cerrado goiano tipo cerradão. *Colloquium Agrariae*, 15, 1, 1-8.

Menezes Filho, A. C. P. de, & Castro, C .F. de S. (2019c). Avaliação de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos totais em extratos farináceos do fruto de *Hymenaea stigonocarpa* L. *Brazilian Journal of Food Research*, Campo Mourão, 10, 2, 158-169.

Menezes Filho, A. C. P. de, & Castro, C. F. de S. (2020). Identificação das classes fitoquímicas de metabólicos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do cerrado Goiano/GO, Brasil. *Revista eixo*. Brasília-DF, 9, 2, 41-52.

Menezes Filho, A. C. P. de, Santos, M. C., & Castro, C. F. de S. (2020). Estudo fitoquímico, bioativo, fotoprotetor e físico-químico do extrato floral de algodãozinho do Cerrado [*Cochlospermum regium*Schrank. (Pilg.)]–Bixaceae. *Revista Arquivos Científicos (IMMES)*. Macapá, AP, 3, 2.-1-13.

Miranda, C. A. S. F., Das Graças Cardoso, M., Batista, L.R., Rodrigues, L.M.A., & Da Silva Figueiredo, A.C. (2016). Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades

antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*. (47). 213-220.

Mishra, R., Gupta, A. K., Kumar, A., Lal, R. K., Saikia, D., & Chanotiya, C.S. (2018). Genetic diversity, essential oil composition, and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activity of *Curcuma longa* L. germplasm collections. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. (10). 75-84.

Oliveira, A. B. A. D., Paula, C. M. D. D., Capalunga, R., Cardoso, M.R.D.I., & Tondo, E.C. (2010). Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Revista HCPA*. (30).279-285.

Oliveira, T. F. V .D. (2017). *Características químicas e microbiológicas do açafrão-da-terra (Curcuma longa)*. Apucarana: Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Porto, L. L., & Rosa, L. R. V. D. (2018). *Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais de coentro (Coriandrum sativum L.) e orégano (Origanum vulgare L.)*. Ponta Grossa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Sankar, R., Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Shivashangari, K.S., & Ravikumar, V. (2013). *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 108:80-84.

Sarikurkcü. C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A.(2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*. 70:178-184.

Sasidharan, I., & Menon, A. N. (2010). Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2, 40-43.

Schirato, G. V., Monteiro, F. M. F., Silva, F. de O., Lima Filho, J. de L., Leão, A. M. dos. A.C., & Porto, A.L.F. (2006). The polysaccharide from *Anacardium occidentale*L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. *Ciência Rural*, 36, 1, 149-154.

Silva, F.T. (2018). *Ação do óleo essencial de gengibre (Zingiber officinale) encapsulado em fibras ultrafinas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína no controle antimicrobiano in situ*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

Singh, G., Kapoor, I. P.S ., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*. 46:3295.

Singh, S., Sankar, B., Rajesh, S., Sahoo, K., Subudhi, E., & Nayak, S. (2011). Chemical composition of turmeric oil (*Curcuma longa* L. cv. Roma) and its antimicrobial activity against eye infecting pathogens. *Journal of Essential Oil Research*. 23,11-18.

Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L.J. (2010).Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*. 15:7532-7546.

Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, & M .G .(2012).Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23, 136–141.

Souza, C .N., De Almeida, A. C., Xavier, M. T. R., Costa, J. P.R ., Da Silva, L .M .V., Martins, E.R. (2017).Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente abacterias isoladas de ovinos com mastite. *Unimontes Científica*. 19, 51-61.

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H.E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food control*. 34, 539-546.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim Salam, A., & Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*.21, 1199-1218.

Teixeira-Loyola, A.B.A., Siqueira, F.C., Paiva, L.F., & Schreiber, A.Z. (2014). Análise Microbiológica de especiarias comercializadas em Pouso Alegre, Minas Gerais. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 6, 515-529.

Teles, A. M., Mouchreck, A. N., & Everton, G. O., Abreu-Silva, A. L., Calabrese, K. S., Almeida-Souza, F. (July 30th 2019a). Comparative Analysis of the Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils of Spices Used in the Food Industry in Brazil, *Essential Oils - Oils of Nature*, Hany A. El-Shemy, IntechOpen.

Teles, A. M., Santos, B. A., Ferreira, C. G., Mouchreck, A. N., Calabrese, K. S., Abreu-Silva, A.L., & Almeida-Souza, F. (December 6th 2019b). Ginger (*Zingiber officinale*) Antimicrobial Potential: A Review, *Ginger Cultivation and Its Antimicrobial and Pharmacological Potentials*, Haiping Wang, IntechOpen.

Teles, A. M., Rosa, T. D., Mouchrek, A. N., Abreu-Silva, A. L., Calabrese, K. D., & Almeida-Souza, F. (2019c). *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, and *Curcuma longa* Essential Oils: Chemical Composition, Antimicrobial and Antileishmanial Activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine :eCAM*.

Yap, P. S. X., Yiap, B. C., & Ping, H. C. (2004). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*. 2004:8:6-14.

Veber, J., Petrini, L. A., Andrade, L. B., & Siviero, J. (2015). Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Campinas, 17, 2, 267-273.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Isadora do Nascimento Oliveira– 30%

Amanda Mara Teles– 20%

Geisa Correia Santos– 15%

Catarina da Silva Saboia– 5%

Bianca Araújo Santos– 5%

Danilo Torres Cardoso– 5%

Adenilde Nascimento Mouchrek– 20%