

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

ANA PAULA MALLMANN

Avaliação Fitoquímica e atividades biológicas dos extratos vegetais de *Ilex Brevicuspis*
Reissek. (Aquifoliaceae)

CASCATEL-PR

Março/2019

ANA PAULA MALLMANN

Avaliação Fitoquímica e atividades biológicas dos extratos vegetais de *Ilex Brevicuspis*
Reissek. (Aquifoliaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Fabiana Gisele da Silva Pinto

CASCADEL-PR

Março/2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

MALLMANN, ANA PAULA

Avaliação Fitoquímica e atividades biológicas dos extratos vegetais de *Ilex Brevicuspis* Reissek. (Aquifoliaceae) / ANA PAULA MALLMANN; orientador(a), FABIANA GISELE DA SILVA PINTO, 2019.

58 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2019.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Atividade antioxidante. 3. Metabólitos secundários. 4. *Dermanyssus gallinae*. I. DA SILVA PINTO, FABIANA GISELE. II. Título.

ANA PAULA MALLMANN

Avaliação Fitoquímica e atividades biológicas dos extratos vegetais de
Ilex Brevicuspis Reissek. (Aquifoliaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia Aplicada e Indicadores de Qualidade No Ambiente Terrestre, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Lilian Cristiane Baeza

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Adriana Fiorini Rosado

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Cascavel, 20 de fevereiro de 2019

Aos meus pais e aos que caminharam junto a mim, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade e pela estrutura para desenvolvimento da pesquisa.

A minha orientadora Prof^a Fabiana Gisele da Silva Pinto, por todo tempo e esforço dedicado a esse trabalho, pelo acolhimento e todo conhecimento transmitido.

Aos meus pais, Canisio Francisco Mallmann e Clarice Terezinha Konrad Mallmann e todos os amigos que me acompanharam nessa jornada e por todo apoio e suporte emocional.

As minhas colegas e grandes amigas, Camila Vogt dos Santos e Marina Martins Nascimento, sem vocês esse período não teria sido o mesmo, obrigada pelo companheirismo, amizade e por tornarem meus dias melhores.

Enfim, a todos que de alguma maneira ajudaram no desenvolvimento e conclusão dessa pesquisa e desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
Avicultura brasileira	10
Problemas Sanitários na Avicultura	11
Salmonelose	11
Atividade Acaricida	12
Resistencia bacteriana e antimicrobianos alternativos	13
Antimicrobianos alternativos: Óleos essenciais e extratos vegetais.....	14
Atividade antioxidante	15
Descrição da planta	17
Capítulo 1: Determinação do perfil fitoquímico e avaliação de atividades biológicas dos extratos de folhas de <i>Ilex brevicuspis</i> Reissek. (Aquifoliaceae).....	19
Resumo	19
Abstract.....	20
Resumen	20
Introdução.....	21
Metodologia.....	23
<i>Coleta e identificação das folhas de <i>Ilex brevicuspis</i></i>	<i>23</i>
<i>Secagem e obtenção do material vegetal.....</i>	<i>23</i>
<i>Obtenção dos extratos vegetais</i>	<i>23</i>
<i>Triagem fitoquímica</i>	<i>24</i>
<i>Microrganismos utilizados</i>	<i>24</i>
<i>Concentração inibitória mínima (CIM).....</i>	<i>25</i>

<i>Concentração bactericida mínima (CBM)</i>	25
<i>Atividade antioxidante</i>	25
<i>Atividade acaricida</i>	26
Resultados e discussões	27
Triagem fitoquímica	27
Atividade antimicrobiana (CIM/CBM)	29
Atividade antioxidante.....	32
Atividade acaricida.....	33
Considerações finais	35
Referências	36
Capítulo 2: Caracterização fitoquímica e avaliação de atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de <i>Ilex brevicuspis</i> Reissek (Aquifoliaceae) frente a sorotipos de <i>Salmonella</i> spp de origem avícola	41
Resumo	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	44
ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	45
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)/ CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	45
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	53

RESUMO

Avaliação Fitoquímica e atividades biológicas dos extratos vegetais de *Ilex brevicuspis* Reissek. (Aquifoliaceae)

O Brasil possui uma grande biodiversidade, diante disso os produtos oriundos do metabolismo secundário das plantas despertam grande interesse pela sua variedade e por ser capaz de promover atividades biológicas de grande importância. A espécie *Ilex brevicuspis* é uma árvore nativa do sul do Brasil, conhecida como caúna da serrá, congonha ou orelha de mico, e foi utilizada nesse trabalho sendo investigada a composição fitoquímica, as atividades antimicrobianas, pela técnica de microdiluição em caldo, atividade antioxidante, pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e atividade acaricida frente a *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778) dos extratos vegetais extraídos das folhas da mesma por etanol (EE), metanol (EM), acetato de etila (EAE), água destilada (Eaq), hexânico (EH) e acetônico (EA). A fitoquímica revelou presença de compostos saponinas, esteroides, taninos, flavonoides e triterpenóides. Os extratos apresentaram resultados de inibição frente a todas as cepas utilizadas, tanto Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo sorotipos de Salmonella. O extrato metanólico apresentou elevada atividade acaricida de 94% e moderada capacidade antioxidante de 81,45%. Também foi verificada atividade antioxidante acima de 70% para os extratos hexânico e acetônico. Portanto, os extratos vegetais de *I. brevicuspis* apresentaram composto do metabolismo secundário capaz de promover atividade biológicas importantes e ser uma alternativa para o desenvolvimento de produtos naturais.

Palavra-Chave: atividade antimicrobiana; compostos bioativos; atividade antioxidante; DPPH, *Dermanyssus gallinae*; metabólitos secundários

ABSTRACT

Phytochemical evaluation and biological activities of *Ilex Brevicuspis* Reissek plant extracts. (Aquifoliaceae)

Brazil has a great biodiversity, because of that the products originating from the secondary metabolism of plants arouse great interest for its variety and for being able to promote biological activities of great importance. The species *Ilex brevicuspis* is a tree native to southern Brazil, known as caúna da serrá, congonha ou orelha de mico, and it was used in this work being investigated the phytochemical composition, antimicrobial activities, by broth microdilution technique, antioxidant activity, by method 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778), of plant extracts extracted from the leaves by ethanol (EE), methanol (EM), ethyl acetate (EAE), distilled water (Eaq), hexanic (EH) and acetonic (EA). Phytochemistry revealed the presence of saponins, steroids, tannins, flavonoids and triterpenoids. The extracts showed inhibition results against all strains used, both Gram-positive and Gram-negative, including *Salmonella* serotypes. The methanol extract showed a high acaricidal activity of 94% and a moderate antioxidant capacity of 81.45%. Antioxidant activity above 70% was also verified for hexane and acetone extracts. Therefore, the vegetable extracts of *I. brevicuspis* presented a secondary metabolism compound capable of promoting important biological activities and being an alternative for the development of natural products.

Keywords: antimicrobial activity, bioactive compounds, antioxidant activity, DPPH, *Dermanyssus gallinae*, metabólitos secundários.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Avicultura brasileira

O Brasil é líder em exportação de carne de frango desde 2011, além de estar na segunda colocação quanto a produção mundial. Responsável por cerca de 34% de toda exportação de carne frango do mundo, sendo o segundo maior produtor mundial, produzindo um total de 13 milhões de toneladas ao ano 2017. Os principais destinos das exportações são: Arábia Saudita, Japão e China.

Os estados que mais se destacam no setor avícola estão presentes na região Sul, sendo o Paraná um dos mais importantes exportadores, representando cerca de 30% de toda a exportação do país. Além disso, esse setor se sobressai quando comparado com outros, devido aos baixos impactos ambientais, sua localidade fora da região amazônica, ocupação de áreas menores e baixo custo de água para sua produção (ABPA, 2018).

Devido a expansão da avicultura no Brasil, a atividade deixou de ser específica da região Sudeste e passou a ser realizada também na região Sul. Com essa diversificação na produção, os produtores receberam incentivos de oferta de crédito e disponibilidade de tecnologias de ponta, para a fabricação de produtos de qualidade em menor tempo (VOGADO et al., 2016).

Além disso, para diminuir o tempo de produção, a nutrição dos frangos também foi modificada, sendo incorporados minerais, vitaminas e antimicrobianos, que eram utilizados para tratamento de patógenos e infecções e atuavam como promotores de crescimento (BELUSSO; HESPANHOL, 2010).

A utilização desses antimicrobianos, primeiramente, foi interessante no desempenho do crescimento das aves, porém com o passar do tempo foi observada um aumento na resistência bacteriana, que se intensificou cada vez mais, até que em 2006 foi deliberada a proibição desses produtos para o melhoramento das aves (RUTZ, 2007).

Com isso, numerosos aditivos têm sido utilizados nas rações como alternativa aos antimicrobianos, como mananoligossacarídeos, os frutoligossacarídeos, o ácido fumárico, o cogumelo desidratado e os probióticos, sendo esses aditivos benéficos ao

trato gastrointestinal dos animais além de não causar riscos ao consumidor (SANTOS et al., 2005).

Como medida de adequação, foram realizados investimentos em tecnologias para aperfeiçoamento na produção, buscando alimentos mais seguros e saudáveis para o consumidor, além de obter alta produtividade associada a qualidade do produto final (BONA et al., 2013).

Problemas Sanitários na Avicultura

Salmonelose

A salmonelose uma doença presente no mundo inteiro, é considerada como uma das mais importantes zoonoses em aves, a qual resulta em severas perdas econômicas, devido à alta mortalidade, baixa produtividade, custos elevados com medicamentos, redução da qualidade do produto final, promovendo gastos excessivos para o controle e erradicação de cepas resistentes de *Salmonella* spp. Essa resistência é agravada pela ampla utilização de antimicrobianos em rações animais e a transmissão desses sorotipos pode acontecer através da carcaça do frango, cortes de frango e ovos, o que a torna um problema de saúde pública uma vez que pode por causar doenças como gastroenterites e febre tifoide (BONI, CARRIJO, FASCINA, 2011; CORTEZ et al., 2006).

As bactérias encontradas no gênero *Salmonella*, pertencem a família Enterobacteriaceae, são reconhecidas como bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e em sua maioria flagelados, com exceção de *S. enterica* Pullorum e da *S. enterica* Gallinarum (GABARON; OTUTUMI; JÚNIOR, 2015). Dentro desse gênero estão presentes duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que dentro da espécie *enterica*, que possui mais de 2.500 sorotipos, ocorre uma subdivisão em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*, apresentando uma nomenclatura diferencial, na qual o nome do sorovar é escrito em letras não itálicas e a primeira letra é maiúscula (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Em vista disso, e devido ao problema de patogenicidade das bactérias do gênero *Salmonella*, é de grande relevância a busca por estudos referentes a saúde das aves e a veiculação de doenças de origem animal, tendo como objetivo métodos de controle e prevenção de surtos de contaminações.

Atividade Acaricida

Outro problema que causa grande preocupação no setor avícola é o uso frequente de produtos químicos, para o controle de pragas, tais como, o *Dermanyssus gallinae* conhecido como “ácaro vermelho”, sendo um possível vetor de *Salmonella* spp. e outros microrganismos, é um ácaro hematófago e possui uma ampla distribuição, sendo a principal praga de galinhas, infestando mais de 30 espécies de aves selvagens (TURNER, 1986; LANCASTER; MEISH, 1986). O ciclo de vida contribui para sua “fama” de praga, isso porque em menos de duas semanas possuem o desenvolvimento completo de ovo a adulto, além de serem favorecidos pelas elevadas temperaturas, podem permanecer por até nove meses em aviários mesmo quando o hospedeiro não está presente, pois podem sobreviver por longos períodos sem alimentação de sangue (WANG et al., 2010; GEORGE et al., 2015; MARRONE et al., 2001).

Além do Brasil, sua presença em aviários de postura é considerada uma ameaça em várias outras partes no mundo, incluindo países como EUA e Japão. Existe uma relação entre infestação de *D. gallinae* com a mortalidade das aves, ocorrendo um aumento de dez vezes nas taxas de mortalidade em infestações mais graves, em que o número de ácaros chega a 500.000 por aves (MUL, et al., 2009; SPARAGANO et al., 2014).

Ademais, as severas perdas econômicas para os produtores com a infestação dessa praga, além da morte das aves podem estar relacionados com o estresse significativo causado devido à alimentação dos ácaros. Alterando padrões de sono e mudanças no comportamento, que são afetados pelo hábito de coçar a cabeça e bicos, além de serem observado aumento da ingestão de água e alimento, diminuição do crescimento e conversão alimentar. Acarretando então na redução da produção e qualidade dos ovos (CHAUVE, 1998; MUL, et al., 2009; SANTANA et al., 2017).

Nesse aspecto, combater *D. gallinae* em aviários de postura torna-se um desafio aos produtores, visto que a forma mais utilizada em seu controle ainda são os produtos sintéticos, porém esses ácaros já se apresentam resistentes a diversos produtos químicos. Além disso, esses produtos apresentam risco ao produtor, deixam resíduos no ambiente e na carne de frango (MARRONE et al., 2001).

Resistencia bacteriana e antimicrobianos alternativos

O uso excedente e indiscriminado de antimicrobianos sintéticos promoveu um aumento exorbitante da resistência dos microrganismos a estes compostos, conseqüentemente o aparecimento dessa resistência impõe várias limitações as opções de combate a esses microrganismos, representando assim, uma ameaça para a saúde pública (SILVEIRA et al., 2006).

A origem dessa resistência pode ser genética ou não. Quando não ocorre de origem genética, o microrganismo não é capaz de transferir essa condição a sua progênie, estando relacionado a processos de multiplicação necessários para as ações antibacterianas das drogas. Já a resistência genética surge por mutação espontânea, podendo ser a partir da alteração ou superprodução do alvo, ou também, pela alteração da permeabilidade do seu envoltório (MOTA et al., 2005). Essas mutações, geram resistências que podem ser transferidas entre as estirpes, sendo estas mudanças consideradas uma manifestação natural em resposta a alterações do meio ambiente em que estão presentes.

Devido aos presentes problemas e a alta demanda por novas substâncias capazes de inibir o crescimento e proliferação de microrganismos resistentes, pesquisas com antimicrobianos de origem natural tem ganhado cada vez mais espaço, como uma alternativa eficaz e econômica aos problemas de saúde pública e na indústria. (DE SOUZA ELLER et al., 2015; SILVEIRA et al., 2006).

Esses antimicrobianos de origem natural podem ser produzidos a partir de plantas com fins terapêuticos, que são promissoras fontes de substâncias bioativas, capazes de proporcionar descobertas eficientes como agentes terapêuticos para combater a acentuada resistência microbiana (ALENCAR et al, 2015).

Logo, produtos derivados de plantas, como os extratos vegetais e óleos essenciais, tem apresentado resultados na inibição de microrganismos patógenos e na produção de toxinas microbianas, podendo atuar como agentes antimicrobianos (MACHADO, RIBEIRO, DRUZIAN, 2013).

Com isso, ressalta-se a importância de novas pesquisas sobre agentes microbianos alternativos de origem vegetal, capaz de promover uma atividade antimicrobiana sobre microrganismos resistentes.

Antimicrobianos alternativos: Óleos essenciais e extratos vegetais

O estudo de novos produtos com ações antimicrobianas tem gerado grande interesse, em diversas áreas como farmacêutica, alimentícia e cosmética. A utilização de bioativos de plantas como possíveis antimicrobianos vem aumentando, pois ocorreu uma crescente rejeição ao uso de produtos sintéticos pelos consumidores (COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017; MACHADO RIBEIRO DRUZIAN, 2013).

Desde a antiguidade, iniciaram-se estudos com bioativos naturais, buscando métodos e processos de identificação de substâncias extraídas em plantas (MACIEL et al., 2013). Atualmente estima-se que 40% dos medicamentos que estão à disposição foram desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, em sua maioria a partir de plantas (CALIXTO, 2003).

Assim sendo, a utilização de plantas como fonte de compostos bioativos é considerada promissora com taxa de crescimento anual de 15%, apresentando diversas vantagens que podem estar relacionadas a vários fatores, como a grande quantidade de estruturas químicas com muitas estruturas homólogas, promovendo economia de recursos e são capazes de ser absorvidas e metabolizadas por microrganismos (CALIXTO, 2003).

Dentre os bioativos naturais pode-se citar os extratos vegetais e óleos essenciais produzidos pelas plantas, que apresentam propriedades bioativas capazes de atuar no controle de crescimento de vários microrganismos, incluindo fungos, leveduras e bactérias (LIMA; GOMES, 2014).

As propriedades antimicrobianas oriundas de óleos essenciais e extratos vegetais são conhecidas pela população a muitos séculos, porém a pouco tempo tem se observado o aumento do interesse científico pelo assunto, a partir de pesquisas que avaliam a atividade biológica de plantas (MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2013).

A grande variedade de metabolitos secundários biossintetizados pelas plantas está diretamente ligada com sua interação com o ambiente, como mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos ou herbívoros e a condições de adaptação e regulação (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Os extratos apresentam metabolitos secundários em sua composição, por isso, são de grande interesse na utilização contra microrganismos patogênicos, insetos e animais. Além disso, apresentam uma variada composição química, muitas vezes, apresentando atividade antimicrobiana e podem ser obtidos através de solventes, como água, e também por solventes orgânicos, como etanol, acetato de etila, hexano e dimetilsulfóxido (WEBER et al., 2014).

Devido à grande variedade de plantas presentes no Brasil e seus inúmeros componentes químicos e produtos que são fontes de óleos essenciais e extratos vegetais com possível atividade biológica, tem se observado um grande aumento de pesquisas nessa área, como estudos realizados com diversas plantas como *Anacardium occidentale* (DA SILVA et al., 2007), *Ilex paraguariensis* (BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMANN, 2009), *Lippia sidoides* (DE LIMA GUIMARÃES et al., 2014), *Prunus myrtifolia* (WEBER et al., 2014) e *Guarea kunthiana* (PANDINI et al., 2015), *Gossypium hirsutum* (DELGADO et al., 2018) *Eucalyptus urograndis* (CARDOSO et al., 2019).

Atividade antioxidante

Atualmente existe um grande interesse em estudos relacionados a antioxidantes, devido as descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Os compostos antioxidantes são os agentes responsáveis pela inibição e redução dos danos causados pelos radicais livres, que são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica nas células. Alguns radicais livres são denominados de reativos de oxigênio

ou de nitrogênio, e o desequilíbrio entre esses radicais e o mecanismo de defesa antioxidante leva ao estresse oxidativo, caracterizado por oxidação das biomoléculas e como consequência perda de funções biológicas e desequilíbrio homeostático.

Os compostos antioxidantes agem no reparo das lesões ocasionadas pelos radicais, processo este relacionado com a remoção dos danos da molécula de DNA e com a reconstituição de membranas celulares danificadas. Em alguns casos, pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais resultando em um aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI, ANTUNES, 1999, PERUZZI et al, 2015).

Alguns compostos isolados de plantas podem acabar substituindo conservantes sintéticos, para isso é de grande importância a realização de teste antioxidantes, esses que necessitam ser seguros para a utilização na alimentação. Para isso é necessário conhecer esse princípio ativo, e conhecer seus efeitos adversos, como toxicidade, potencial carcinogênico, entre outros (GONÇALVES et al., 2015).

Tanto óleo essencial como os extratos vegetais possuem compostos que podem apresentar atividade antioxidante, demonstrando eficiência, como por exemplo os fenóis, que agem como agentes redutores e os flavonoides e taninos, que são responsáveis pela inibição da degradação oxidativa de lipídios, sendo assim esses produtos de origem natural tornam-se fortes candidatos a estudos referentes a esta atividade biológica (MORAIS et al, 2009).

Algumas plantas já foram avaliadas frente seu potencial antioxidante, sendo elas: alguns extratos de *Punica granatum*, que apresentaram compostos com capacidade redutora (JARDINI, FILHO, 2007), óleos essenciais de *Croton zehntneri* e *Croton argyrophyllodes* também apresentam atividade antioxidante (MORAIS et al, 2006), óleo essencial de *Myrcia oblongata* (SANTANA et al., 2018), extrato de *Myracrodruon urundeuva* (LOPES et al., 2018), e dentro do gênero *Ilex*, a atividade do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* também foi relatado (BOAVENTURA, 2015), assim como dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*, *I. brevicuspis*, *I. pseudobuxus*, *I. argentina*, *I. dumosa*, *I. theezans* (FILIP et al., 2000).

Descrição da planta

A família Aquifoliaceae é considerada cosmopolita, ocorrendo em quase todas as regiões do planeta, totalizando 600 espécies e distribuídas em um único gênero, *Ilex*, das quais cerca de 60 ocorrem no Brasil, principalmente nos estados do Sul e Sudeste (LORENZINI, 2006).

As sementes das espécies de *Ilex* são alimentos extremamente importantes para numerosas espécies de aves e alguns animais selvagens, portanto, as espécies *Ilex* desempenham papéis importantes nos ecossistemas locais, além de serem, economicamente, importantes fontes de chás, medicamentos e plantas ornamentais por causa de seus frutos vermelhos persistentes e muitas vezes folhas distintivas. Uma das mais importantes plantas desse gênero, é a *Ilex paraguasiense*, sendo a mais comercializada na América do Sul, consumida como erva mate e apresentando diversas propriedades biológicas, como atividade antioxidante, antiobesidade e atividade antimicrobiana (SHI et al., 2016; YAO et al, 2016, ARÇARI et al, 2009, WU et al, 2017).

A composição química da erva mate inclui xantinas, taninos, ácidos clorogênicos, triterpenoides e saponinas, além de apresentar óleo essencial com aproximadamente 196 compostos voláteis (FAGUNDES et al., 2015).

Algumas espécies de *Ilex* são muito usadas com propósito medicinal, dentre elas, *I. chinensis*, *I. cornuta*, *I. rotunda*, *I. cornuta*, *I. pernyi*, e *I. pubescens* que apresentam propriedades para baixar febre, minimizar a fleuma e revigorar fígado e pulmões (YI et al, 2016).

Nesse aspecto, estudos com plantas desse gênero são promissoras, sendo a espécie *Ilex brevicuspis* uma árvore nativa do sul do Brasil, conhecida como caúna da serrá, congonha ou orelha de mico (Figura 1). Caracterizada como uma árvore perenifólia, pode atingir até 25 metros e diâmetro do tronco de até 75 centímetros, suas folhas são simples e alternas com a margem dentada, suas flores podem apresentar coloração amarela ou podem ser brancas, com floração de outubro a dezembro e frutificação de janeiro a março, sendo usada como adulterante no mate. Apesar dos poucos estudos sobre essa espécie, foi verificada na literatura a presença de dois

diferentes grupos de saponinas no extrato etanólico das folhas dessa planta (TAKETA et al, 2000, CARVALHO, 2015).



Figura 1. Morfologia de *Ilex brevicupis*

Portanto, visto que há poucas investigações acerca das atividades biológicas, realça-se a necessidade de pesquisas com a espécie *I. brevicupis*, buscando explorar todo seu potencial como agente antimicrobiano e antioxidante, bem como sua atividade acaricida sob *Dermanyssus gallinae*.

Capítulo 1: Determinação do perfil fitoquímico e avaliação de atividades biológicas dos extratos de folhas de *Ilex brevicuspis* Reissek. (Aquifoliaceae)

Determination of the phytochemical profile and evaluation of biological activities of leaf extracts of *Ilex brevicuspis* Reissek. (Aquifoliaceae)

Determinación del perfil fitoquímico y evaluación de actividades biológicas de extractos de hojas *Ilex brevicuspis* Reissek. (Aquifoliaceae)

Resumo

O gênero *Ilex* compreende mais de 500 espécies sendo considerada uma fonte promissora para a extração de princípios ativos com diversas atividades biológicas. Diante desse foco, este trabalho utilizou folhas de *Ilex brevicuspis* Reissek para produção de extratos, objetivando a determinação fitoquímica, antioxidante, antibacteriana e acaricida sobre *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778). As folhas foram coletadas, secas e trituradas em moinho, e seus extratos produzidos com diferentes solventes, etanol (EE), metanol (EM), acetato de etila (EAE) e água destilada (Eaq). As análises fitoquímicas revelaram três grupos de compostos: saponinas, esteroides e taninos. Os extratos apresentaram atividade inibitória e bactericida para cepas padrões (Gram-negativas e positivas) e para dez sorotipos de *Salmonella* spp. O extrato EM apresentou os melhores resultados de CIM para as cepas padrões, variando de 6,25 mg/mL a 50 mg/mL e para CBM de 6,25 mg/mL a 100 mg/mL. Para os sorotipos de *Salmonella* o extrato EE apresentou a melhor atividade antibacteriana, variando de 25 mg/mL a 50 mg/mL para CIM e 200 mg/mL para CBM. O extrato EM revelou elevada atividade acaricida de 94% e moderada capacidade antioxidante de 81,45%. Os ensaios demonstraram que os extratos EM e EE de *I. brevicuspis* representam um potencial alternativo para controle de bactérias e ácaros, demonstrando uma nova perspectiva para desenvolvimento de produtos naturais a partir de uma espécie nativa.

Palavras chaves: atividade antimicrobiana; compostos bioativos; atividade antioxidante; DPPH, *Dermanyssus gallinae*

Abstract

The genus *Ilex* comprises about 500 species being considered a promising source for the extraction of active principles with different biological activities. Before this approach, this work used *Ilex brevicuspis* Reissek leaves for the production of extracts, aiming the phytochemical, antioxidant, antimicrobial and acaricide determination in *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778). The leaves were collected, dried and ground in a mill, and their extracts produced with different solvents: ethanol (EE), methanol (EM), ethyl EAEate (EAE) and water (Eaq). Phytochemical analyses revealed three groups of compounds: saponins, steroids and tannins. The extracts showed inhibitory and bactericidal activity for standard strains (Gram-negative and positive) and for ten serotypes of *Salmonella* spp. The EM extract showed the best MIC results for the standard strains, ranging from 6.25 mg/mL to 50 mg/mL and for MBC from 6.25 mg/mL to 100 mg/mL. For serotypes of *Salmonella*, EE extract presented the best activity, varying from 25 mg/mL to 50 mg/mL for MIC and 200 mg/L for MBC. EM extract showed a high acaricidal activity of 94% and moderate antioxidant capacity of 81.45%. Assays demonstrated that EM and EE extracts of *I. brevicuspis* represent an alternative potential for the control of bacteria and mites, demonstrating a new perspective for the future development of natural products from a native species.

Key words: antimicrobial activity; bioactive compounds; antioxidante activity; DPPH, *Dermanyssus gallinae*

Resumen

El género *Ilex* comprende másde 500 especies siendo considerado una fuente prometedora para la extracción de principios activos con diferentes actividades biológicas. Dado este enfoque, este trabajo utilizó hojas de *Ilex brevicuspis* Reissek para la producción de extractos, con el objetivo de la determinación fitoquímica, antioxidante, antimicrobiana y acaricida en *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778). Las

hojas se recolectaron, secaron y trituraron en un molino, y sus extractos se produjeron con diferentes solventes: etanol (EE), metanol (EM), EAEato de etilo (EAE) y agua (Eaq). Los análisis fitoquímicos revelaron tres grupos de compuestos: saponinas, esteroides y taninos. Los extractos mostraron actividad inhibitora y bactericida para cepas (Gram negativas y positivas) y para diez *Salmonella* spp. El extracto de EM mostró los mejores resultados de CIM para las cepas estándar, con un rango de 6.25 mg/mL a 50 mg/mL y para CBM de 6.25 mg/mL a 100 mg/mL. Para los serotipos de *Salmonella*, el extracto de EE mostró la mejor actividad, con un rango de 25 mg / mL a 50 mg / mL para MIC y 200 mg / mL para CBM. El extracto de EM mostró una alta actividad acaricida del 94% y una moderada capacidad antioxidante del 81,45%. Las pruebas demostraron que los extractos de EM y EE de *I. brevicuspis* representan un potencial alternativo para el control de bacterias y ácaros, demostrando una nueva perspectiva para el desarrollo futuro de productos naturales de una especie nativa.

Palavras clave: actividad antimicrobiana; compuestos bioactivos; actividad antioxidante; DPPH, *Dermanyssus gallinae*

Introdução

As plantas apresentam diversos componentes químicos envolvidos naturalmente no seu metabolismo secundário e estes podem ser potenciais fontes de compostos bioativos. Aproximadamente 40% dos novos medicamentos, que estão atualmente disponíveis, derivam direta ou indiretamente de fontes naturais vegetais (GUILARDUCCI et al., 2016). Os produtos naturais, como extratos vegetais, têm sido utilizados como aditivos fitogênicos na alimentação de animais confinados, com o objetivo de melhorar o desempenho das aves comerciais e otimizar a produção avícola (FASCINA, 2011). Além disso, a utilização de fitogênicos como aditivos alimentares, não deixa resíduos químicos como a exemplo os antibióticos sintéticos, tornando-se mais seguro para o uso em larga escala (BRENES; ROURA, 2010).

Além disso, o aumento de pesquisas relacionadas a esses compostos vegetais está diretamente relacionado com a elevada resistência a antimicrobianos convencionais, que

é atualmente um dos mais relevantes problemas na saúde pública, visto que o uso inapropriado, incluindo as quantidades exacerbadas utilizadas, tem causado aumento da incidência de microrganismos resistentes (FREITAS et al., 2014; LOUREIRO et al., 2016).

Outra utilização de bioativos vegetais está relacionada ao setor avícola como alternativa ao uso de compostos químicos no controle de pragas, como *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae), conhecido como a principal praga relacionada aos aviários de poedeiras e que causam grandes danos a esses animais, como: irritação, inquietação, anemia, interferindo assim na produção e qualidade dos ovos e até mesmo levar a morte do animal (FOCHLAY et al., 2017).

Vários estudos apontam também que alguns compostos bioativos de plantas podem vir a substituir, ou mesmo diminuir a quantidade de conservantes sintéticos utilizados nas indústrias. Para isso, é de grande importância a avaliação de suas atividades biológicas para que seja verificado o seu uso de forma segura. Neste sentido, é necessário pesquisar o princípio ativo, e conhecer seus efeitos adversos, como toxicidade, potencial carcinogênico, antioxidante, entre outros (GONÇALVES et al., 2015).

Ilex brevicuspis Reissek pertence à família Aquifoliaceae, é uma árvore nativa do sul do Brasil, conhecida popularmente como caúna da serra, congonha ou orelha e são escassos os relatos na literatura sobre suas atividades biológicas. A espécie mais estudada deste gênero é a *Ilex paraguayensis* (erva-mate) comumente utilizada na forma de chás, que apresenta diversas propriedades biológicas, como atividade antioxidante, antiobesidade e atividade antimicrobiana (ARÇARI et al., 2009).

Vários fitoquímicos biologicamente ativos estão presentes no grupo de plantas *Ilex spp.* que podem promover benefícios a saúde, como compostos fenólicos (ácidos clorogênicos) e metilxantinas (cafeína e teobromina), flavonóides (rutina, quercetina e kaempferol), saponinas, aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas (C, B1 e B2) (Heck & de Mejia, 2007).

Nesse aspecto de saúde, o gênero demonstra diferentes potencialidades terapêuticas e nutricional, porém ainda é incipiente pesquisas do ponto de vista de uso destes compostos bioativos no controle de microrganismos patogênicos e pragas urbanas.

Diante deste panorama, o objetivo desse estudo foi determinar o perfil fitoquímico dos extratos vegetais das folhas de *I. brevicuspis*, bem como avaliar seu potencial antibacteriano sobre cepas padrões microbianas e de *Salmonella* spp, além da atividade antioxidante e ação acaricida contra *D. gallinae*.

Metodologia

Coleta e identificação das folhas de Ilex brevicuspis

A coleta das folhas foi realizada no parque ecológico Paulo Gorski, localizado no município de Cascavel, região oeste do estado do Paraná, 24°57'51.61"S e 53°26'14.80"O. A planta usada neste estudo foi encaminhada para identificação e após confirmação da espécie para *Ilex brevicuspis* foi depositada com o *voucher* UNOP 8924 no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE.

Secagem e obtenção do material vegetal

Após a coleta o material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar a 40°C, por 48 horas, e posteriormente foi moído em moinho de facas do tipo Willey com granulometria de 0,42 mm. O pó obtido foi armazenado em recipientes de vidro fechado e ao abrigo de luz até o uso para produção dos extratos. O rendimento dos extratos vegetais foi calculado pela equação 1.

$$\text{Porcentagem (\%)} = \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa vegetal seca e moída (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Obtenção dos extratos vegetais

Foi realizada a metodologia de Pandini et al. (2015) com modificações. O material vegetal seco (10g) e 100 mL dos solventes: água destilada (EAq), metanol P.A. (EM), etanol P.A. (EE) e acetato de etila P.A. (EAE), foram mantidos em agitador rotativo à 220 rpm durante 24 horas. Após este período, a solução foi filtrada utilizando papel filtro Whatman nº 1 e centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram submetidas à rotaevaporação para total eliminação dos

solventes, exceto o extrato aquoso, obtendo um extrato bruto ao final do processo. O extrato foi armazenado ao abrigo da luz em freezer a 4° C.

Triagem fitoquímica

Os testes fitoquímicos para a detecção da presença de alcalóides, saponinas, esteróides, triterpenóides, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, taninos e cumarinas foram realizados de acordo com a metodologia desenvolvida por Matos (1997) com modificações.

Microrganismos utilizados

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel/PR. Para os ensaios foram utilizados diferentes microrganismos padrões identificados, sendo seis cepas Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), quatro Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus subtilis* (CCD-04). Foram testados também, 10 sorotipos de *Salmonella enterica* de maior ocorrência na região Oeste do Paraná, Brasil, isoladas de aviários de frango de corte da região, sendo: *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Gallinarum*, *S. Mbandaka*, *S. Give*, *S. Saintpaul*, *S. Orion* e *S. Agona*, cedidos por um laboratório veterinário de Cascavel, Paraná, Brasil (SCUR et al., 2014).

Para o teste de atividade antimicrobiana, as bactérias foram recuperadas em caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI) e incubados por 24 h a 36±0,1°C. Após este período, as cepas foram repicadas em meio Ágar Muller Hinton (AMH), e padronizadas em solução salina (0,85%) resultando na concentração final de 1×10⁵ UFC/mL de acordo com a escala Mac Farland.

Concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios foram realizados pelo método de microdiluição em caldo conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2015) e SCUR et al. (2014), em placas de 96 poços. Para a determinação da CIM dos extratos vegetais foram adicionados 150µL de caldo Müller-Hinton (MH) em todos os poços, 150 µL dos extratos vegetais foi acrescentado no primeiro poço, e foi realizada diluições seriadas com concentrações variando de 200 até 0,09 mg/mL nos poços posteriores. Após as diluições, foram distribuídas alíquotas de 10 µL com microrganismos em cada poço e as placas foram incubadas a 36°C durante 24 horas.

Para o controle negativo foi utilizado o antibiótico comercial gentamicina (200 mg/mL. Como controle positivo foi adicionado o inóculo ao caldo MH, sem presença do extrato para verificar a viabilidade do microrganismo testado. Também foi realizado o controle de esterilidade dos extratos solubilizados em metanol P.A. e um controle do diluente metanol para verificar se houve interferência no ensaio. Após a incubação, foi utilizado 10 µL da solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % como revelador colorimétrico para cada poço da placa. A CIM foi realizada em triplicata, sendo possível determinar a menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Concentração bactericida mínima (CBM)

Após a realização do ensaio da CIM, antes da adição de TTC, foi retirada uma alíquota de 2 µL de cada poço e inoculada em placas com MH. As placas foram incubadas durante 24 horas a temperatura de 36° C. Após este período, foi observado se houve crescimento bacteriano na placa, para então determinar qual foi a menor concentração dos extratos vegetais capaz de causar a morte dos microrganismos. A CIM e a CBM dos extratos vegetais foram classificadas de acordo com Pandini et al. (2015), sendo a atividade enquadrada em uma das 4 classes: elevada (12,5 mg/mL), moderada (12,5 a 25 mg/mL), baixa (50 a 100 mg/mL) e muito baixa (>100 mg/mL).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada de acordo com as metodologias propostas por Rufino et al. (2007) e Weber et al. (2014), pelo método da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Uma alíquota de 0,1 mL dos extratos (1,75 mg/mL a

35 mg/mL) foi tratada com 3,9mL de solução metanólica de DPPH 0,2mM e levemente homogeneizadas. A solução foi deixada em repouso ao abrigo de luz durante 30 minutos. As amostras foram mensuradas em espectrofotômetro com absorvância de 515 nm. Como controle negativo foi utilizado 0,1mL de solução controle (álcool metílico, acetona e água). Para controle positivo foi utilizado o antioxidante butil-hidroxi-tolueno (BHT). A calibração do espectrofotômetro foi realizada com álcool metílico. O cálculo da capacidade de sequestro do radical livre foi expresso pela equação 2, onde Abs_0 é a absorvância do controle e Abs_1 é a absorvância da amostra. Os testes foram realizados em triplicata.

$$I\%: \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100 \quad (2)$$

Atividade acaricida

Para o pré-teste de atividade acaricida de aplicação tópica, os ácaros foram coletados em aviário de postura comercial, sem histórico de utilização de acaricidas, localizado na região Oeste do estado do Paraná, Brasil, sendo o experimento realizado no mesmo dia da coleta. Os extratos vegetais foram solubilizados em acetona nas concentrações de 10%, 7,5%, 5% e 2,5%. Para a aplicação dos extratos, trinta fêmeas ingurgitadas e ativas foram acondicionadas em papel filtro estéril (1 × 1,5 cm) parcialmente dobrados ao meio para a aglomeração dos ácaros, sendo aplicado 20 µL dos extratos, em 5 repetições. Posteriormente, os ácaros foram incubados em tubos de fundo chato fechados com tampão de algodão hidrofóbicos e tecido voil. Foi realizado um controle, com o mesmo número de ácaros e repetições, aplicando 20 µL de acetona. Após 48 horas foi analisada a mortalidade, sendo que os ácaros que não se moviam ao serem tocados com um pincel foram considerados mortos. Os dados foram analisados por teste ANOVA fatorial, seguido de teste de acompanhamento Kruskal-Wallys para dados não paramétricos, para comparação entre as médias dos extratos utilizando o programa Statistica 7.0, para determinar a diferença da mortalidade dos tratamentos, com nível de significância de 5%.

Resultados e discussões

Triagem fitoquímica

Os extratos vegetais de *Ilex brevicuspis* preparados com diferentes solventes, apresentaram os seguintes rendimentos: EAE (4,3%), EE (13%), EM (22%) e EAq (47,47%). Vários são os fatores capazes de influenciar no rendimento dos extratos vegetais, tais como temperatura, tempo de extração, mas principalmente o solvente utilizado, sendo que sua polaridade e solubilidade influenciam diretamente sobre o rendimento dos mesmos (CABANA et al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013).

De acordo com a determinação fitoquímica, os extratos vegetais EAE, EE e EM demonstraram a presença dos compostos das classes: saponina, esteroides triterpenoides, e esteroides livres. O EM apresentou maior diversidade de grupos metabólitos secundários, contendo as três classes de compostos já citados, além dos taninos condensados e o EAq apresentou somente a classe das saponinas (Tabela 1).

Tabela 1 - Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais foliares de *Ilex brevicuspis* Reissek.

Metabólitos secundários	EAq	EAE	EE	EM
Saponinas	+	+	+	+
Esteróides	-	+	+	+
Triterpenoides				
Esteróides livres	-	+	+	+
Triterpenoides	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-

Antocianidinas	-	-	-	-
Flavonas	-	-	-	-
Flavanóis	-	-	-	-
Xantonas	-	-	-	-
Chalconas	-	-	-	-
Auronas	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	-
Taninos condensados	-	-	-	+
Cumarinas	-	-	-	-

+ Presença; - Ausência; Extrato aquoso (EAq); Extrato metanólico (EM); Extrato etanólico (EE) e Extrato de acetato de etila (EAE). Fonte: Autores.

Dentro do gênero *Ilex*, as classes de metabólitos secundários mais comumente encontradas quando extraídos com etanol e em água são saponinas e os compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides (FILIP et al., 2000; TAKETA et al., 2002; COSTA et al., 2017). O que corrobora com o nosso estudo, visto que também foram encontrados saponinas e taninos (contidos na classe dos compostos fenólicos). Além disso, pesquisas sobre a composição química completa de extratos de *I. brevicuspis* não foram reportadas na literatura, apenas um estudo semelhante a este foi desenvolvido por Taketa et al. (2002) que detectou a presença de triterpenos e triterpenoides do extrato etanólico dessa espécie pela prospecção fitoquímica.

A variação de classes de compostos verificado em diferentes espécies está relacionada com diversos fatores como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, ritmo circadiano, poluição atmosférica e interação com o ambiente, que podem afetar a via metabólica e, conseqüentemente, influenciar nos compostos produzidos pela planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Atividade antimicrobiana (CIM/CBM)

A variação na atividade antimicrobiana observada no estudo foi dependente do solvente extrator e do microrganismo testado, e os dados foram classificados conforme Pandini et al., (2015). O EM apresentou os melhores resultados de CIM (12,5 mg/mL e 200 mg/mL), sendo que sua atividade apresentou grande variação, foi classificada de elevada a muito baixa, para as cepas padrões testadas, apresentando atividade elevada para cepas Gram-positivas. Para o EE verificou-se atividade considerada moderada a muito baixa (12,5 mg/mL e 200 mg/mL), apresentando as maiores atividades inibitórias e bactericidas para *E. coli* e *S. aureus*, *S. epidermidis*. Já o EAE demonstrou CIM e CBM variando entre moderada e muito baixa (12,5 mg/mL e 200 mg/mL) apresentando o melhor resultado para *S. epidermidis*, (CIM de 12,5 mg/mL e CBM de 100 mg/mL). Dentre todos os extratos testados, o EAq apresentou os menores valores para todos os microrganismos, tendo sua atividade variando de baixa a muito baixa (50 mg/mL e 200 mg/mL) e não apresentou atividade inibitória ou bactericida para as cepas *E. faecalis* e *K. pneumoniae*; corroborando com Lima et al. (2021) que ressalta que os metabólicos que melhor exibem potencial antibacteriano em extratos vegetais apresentam em sua composição a combinação de saponinas, flavanóides e taninos, e neste estudo somente a presença de saponinas foi detectado em EAq. Os extratos aquosos de erva-mate no estudo de Fayad et al. (2020) apresentaram atividade antibacteriana apenas sobre *S. aureus* (3,75 mg/mL) quando comparado ao antibiótico gentamicina.

Já para os sorotipos de *Salmonella*, o EE apresentou atividade inibitória entre moderada e baixa, seguido do EM, com atividade entre baixa e muito baixa, e os EAE e EAq apresentaram atividades consideradas muito baixas (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em mg/mL dos extratos foliares de *Ilex brevicuspis* frente a diferentes cepas padrão e sorotipos de *Salmonella* spp.

Cepas	EM	EE	EAE	EAq
Bactérias	(CIM / CBM	(CIM / CBM	(CIM / CBM	(CIM / CBM

	mg/mL)	mg/mL)	mg/mL)	mg/mL)
Gram-positivas				
<i>S. aureus</i>	3,12/6,25	12,5/100	25/100	200/200
<i>S. epidermidis</i>	12,5/100	12,5/200	12,5/100	100/-
<i>B. subtilis</i>	6,25/12,5	50/200	25/50	200/-
<i>E. faecalis</i>	50/100	100/-	-/-	-/-
Gram-negativas				
<i>E. coli</i>	50/200	12,5/100	25/100	50/-
<i>P. aeruginosa</i>	6,25/50	50/100	25/50	50/200
<i>K. pneumoniae</i>	200/200	50/200	200/-	-/-
<i>P. mirabilis</i>	12,5/50	100/200	200/-	100/200
<i>Salmonella</i>				
S. Agona	100/-	50/-	200/-	200/200
S. Santpaul	100/200	25/200	200/-	200/200
S. Heidelberg	100/-	25/200	100/200	200/200
S. Orion	50/200	25/200	200/200	200/200
S. Give	100/200	25/-	50/200	200/200
S. Gallinarium	50/200	25/-	50/200	200/200
S. Mbandaka	100/-	50/200	200/200	200/200
S. Infantis	100/-	50/-	200/-	200/200
S. Typhimurium	50/-	50/-	200/200	100/200
S. Enteritidis	100/-	50/-	200/-	200/200

(-) Sem atividade. Fonte: Autores.

Nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para extratos de *Ilex* spp. Pode-se evidenciar a inibição de *P. mirabilis* e *E. coli* quando submetidas ao extrato etanólico de *Ilex paraguarienses*, sendo indicado o uso do extrato na concentração de 400 mg/mL (COSTA et al., 2017), também a atividade antimicrobiana dos extratos hexânico e aquoso de *Ilex paraguarienses* frente a *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (PENTEADO et al., 2016). Além de também ter sido relatada a atividade antimicrobiana de *Ilex latifolia* frente a *S. aureus* (CIM 100 mg/mL), *P. aeruginosa* (CIM 100 mg/mL), *E. coli* (CIM 100 mg/mL) (LI et al., 2013).

A elevada atividade do EM pode estar relacionada com a presença de taninos na sua composição, sendo um grupo com comprovada atividade antimicrobiana. Foram encontrados taninos condensados que apresentam uma ampla diversidade na sua estrutura, diversidade de posições entre suas ligações (MONTEIRO et al., 2005). Seu modo de ação pode estar relacionado à formação de complexos com enzimas e proteínas microbianas, levando assim a uma inativação das suas funções, inibindo o transporte de elétrons através de membranas, ou ainda causar alterações em íons relacionados a atividades de algumas enzimas essenciais a célula, o que lhes confere a sua elevada atividade antimicrobiana (MENDEZ et al., 2012; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Já a atividade antimicrobiana dos EAq, EAE e EE pode ser atribuída a presença das saponinas na sua composição. Esses compostos são sintetizados a partir da via isoprenóide do metabolismo secundário de plantas, e foram identificadas nos extratos do presente estudo, e já apresentam ação antimicrobiana relatada, agindo sobre a membrana celular bacteriana, formando complexos com os esteróis e produzindo grandes poros, que alteram sua permeabilidade, causando danos ao microrganismo (PUENTES, 2009).

A detecção de alguma classe de composto nos extratos e a não observação de atividade antimicrobiana do mesmo, sugerem que alternativamente esses extratos se combinado seu uso a antibióticos, podem exibir efeito sinérgico potencializando ação antibacteriana, embora o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não tenha sido elucidado (SANTOS et al., 2020).

Atividade antioxidante

O EM apresentou os melhores resultados de capacidade de sequestro do radical DPPH, com 81,45% de atividade antioxidante quando testado a 10 mg/mL. Os EE e EAq atingiram porcentagem de atividade antioxidante acima de 70% e 61% nas concentrações de 30 e 35 mg/mL, respectivamente. Já o EAE apresentou cerca de 65% de atividade quando testado a 15%. (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos vegetais foliares de *Ilex brevicuspis* por sequestro do radical DPPH.

Concentração (mg/mL)	Controle BHT	EM	EE	EAE	EAq
35	-	-	-	-	61,62±0,87
30	-	-	70,37±0,56	-	48,08±0,78
25	-	-	51,75±0,86	-	30,87±0,84
20	-	-	32,83±0,63	-	19,78±0,82
15	-	-	18,54±0,75	65,20±0,64	-
10	-	81,45±0,68	-	48,48±1,21	-
5	-	68,72±2,13	-	35,53±0,83	-
2	-	52,35±0,85	-	20,18±0,69	-
1,75		31,34±0,73	-	-	-
1	98,57±0,54	-	-	-	-
0,5	77,32±0,67	-	-	-	-
0,25	54,46±4,69	-	-	-	-

0,1 37,85±2,99 - - - -

(-) não testado; média ± desvio padrão. Fonte: Autores.

Não foram encontrados relatos da atividade antioxidante de *I. brevicuspis* pelo método do sequestro do radical do DPPH. No entanto, foi relatada a atividade antioxidante dos extratos aquosos de outras espécies de *Ilex*, *I. paraguariensis*, *I. dumosa*, *I. argentina*, *I. theezans*, e *I. pseudobuxus*, a partir do método de oxidação de lipossomos oxidados por dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH) e os extratos apresentaram compostos fenólicos na sua composição, o que justifica a presença de atividade antioxidante (FILUPI et al., 2000).

A atividade antioxidante de *I. paraguarienses* foi verificada na literatura, sendo testados EAq e hidroalcoólico de folhas “in natura” secas e cancheadas, e o resultado variou de 28% a 48%, o que torna os nossos resultados promissores, tendo em vista que *I. brevicuspis* apresentou um maior percentual de atividade antioxidante (EFING et al., 2009).

Muitas pesquisas relacionadas à atividade antioxidante de produtos naturais têm sido realizadas com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, uma vez que esses podem ser potencialmente tóxicos. A atividade antioxidante de produto a base de plantas está relacionada com os compostos que são capazes de proteger o sistema biológico das plantas contra um potencial efeito dos processos oxidativos (FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013). A atividade antioxidante pode variar de acordo com os solventes utilizados para a extração do material vegetal, e também conforme sua polaridade e solubilidade (FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013; ONIVOGUI et al., 2016).

Atividade acaricida

De acordo com o pré-teste tópico para a atividade acaricida, observou-se que o EM apresentou a maior percentagem de mortalidade (94%) quando aplicado a 10%, seguido pelos EE (79,33%) e EAE (76,66%) que não apresentaram diferença estatística entre si. O mesmo padrão de resposta foi observado quando aplicado na concentração a 7,5%,

sendo que EM apresentou maior porcentagem de mortalidade, com 77,30%, seguido pelos EE (56%) e EAE (57,33%). Para as concentrações de 5% e 2,5%, as porcentagens de mortalidade observadas variaram de 46 % a 10%. Somente EAq não apresentou atividade acaricida sobre *D. gallinae* (Tabela 5).

Tabela 5 - Mortalidade de *Dermanyssus gallinae* após 48 horas de contato tópico com extratos vegetais das folhas de *Ilex brevicuspis*.

Concentração Extrato %	Mortalidade (%)		
	EM	EE	EAE
0*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
2,5	20,66±6,69 D a	10,66±6,70 D b	17,33±5,34 D c
5	46,67±3,95 C a	23,33±9,34 C b	39,33±2,45 C c
7,5	77,30±3,09 B a	56,00±3,57 B b	57,33±4,76 B b
10	94,00±2,44 A a	79,33±4,48 A b	76,66±3,65 A b

Percentual de mortalidade média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas iguais não diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$). *Para comparação do controle foi utilizado teste de Ducan. Fonte: Autores.

Não foram encontrados na literatura estudos utilizando extratos vegetais de *Ilex* spp. avaliando a atividade acaricida dos mesmos. Os melhores resultados apresentados pelo EM pode estar relacionado à presença de taninos em sua composição fitoquímica. Alguns bioensaios foram conduzidos por Baran et al., 2020 por contato do ácaro *D. gallinae* com o extrato de *Trachyspermum ammi* e demonstrou que houve baixa mortalidade (45,8%).

Os taninos presentes no EM apresentam habilidade de ligar-se com proteínas e macromoléculas apresentando atividades tóxicas, além de serem adstringentes, sua toxicidade varia de acordo com o peso da molécula, quanto mais pesado maior efeito tóxico (MONTEIRO et al., 2005). Além disso, podem se mostrar benéficos para a

saúde, diversos estudos apontam atividade biológica comprovada como antioxidante (SMIRNOVA et al., 2009), bactericida (BANSO; ADEYEMO, 2007), nematocida (ALONSO-DIAZ et al., 2008), inseticida (CORRÊA; SALGADO, 2011) e acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FERNANDEZ-SALA et al., 2011), porém não foram encontrados na literatura estudos que esclareçam o modo de ação dos taninos sobre o ácaro, com isso este estudo sugere que a sua presença possa ser um aditivo interessante no controle de ácaros. O efeito acaricida pode ocorrer por diferentes mecanismos, como por exemplo, inibição da alimentação, oviposição e crescimento, alterações biológicas ou mesmo mortalidade. Neste contexto, o aumento de estudos utilizando produtos de origem vegetal para o combate do ácaro é de interesse comercial como uma alternativa aos acaricidas sintéticos, que podem causar problemas de contaminação ambiental e promover o desequilíbrio biológico do ecossistema (FERRAZ et al., 2017).

O uso de pesticidas convencionais no manejo de pragas está enfrentando problemas como o desenvolvimento de resistência a pragas, poluição ambiental e impacto na saúde humana, juntamente com obstáculos regulatórios para aprovação e comercialização de novos pesticidas ecológicos, em conformidade com a tendência global de produtos livres de resíduos gêneros alimentícios. Nesse contexto, os pesticidas botânicos representam produtos alternativos valiosos a serem explorados (Baran et al., 2020).

Considerações finais

Os extratos de *I. brevicuspis* demonstraram por meio da determinação fitoquímica a presença dos grupos saponinas, esteroides e taninos. A atividade antimicrobiana sobre as cepas padrão e de *Salmonella* foi satisfatória permitindo o controle de crescimento bacteriano. O EM apresentou a melhor percentagem antioxidante de 81,45% quando aplicado a 10 mg/mL, e também, demonstrou maior eficiência em relação a atividade acaricida quando aplicado a concentrações de 10% e 7,5%.

Referências

- Arçari, D. P., Barthchewsky, W., Santos, T. W., Oliveira, K. A., Funck A., Pedrazzoli, J., Edrazzoli, J., Souza, M. F. F., Saad, M. J., Bastos, D. H. M., Gambero, A., Carvalho, P. O. & Ribeiro, M. L. (2009). Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* (Silver Spring, Md.), 17(12), 2127-2133. doi: 10.1038/oby.2009.158.
- Alonso-Días, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilarcaballero, A. J. & Hoste, H. (2008). In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*, 153, 313-319. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.042.
- Banso, A. & Adeyemo, S. O. (2007). Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. *African Journal of Biotechnology*, 15, 1785-1787. doi: 10.5897/AJB2007.000-2262.
- Baran, A. I., Jahanghiri, F., Hajipour, N., Sparagano, O. A. E., Norouzi, R. & Moharramnejad, S. (2020). In vitro acaricidal activity of essential oil and alcoholic extract of *Trachyspermum ammi* against *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary parasitology* 278, 1-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109030.
- Brenes, A. & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158, 1-14. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007.
- Cabana, R., Silva, L. R., Valentao, P., Viturro, C. I. & Andrade, P. B. (2013). Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 48, 49-56. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.04.003.
- CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), [S. l.], v. 35, n. 2, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3>

- Costa, D. E. M., Racanicci, A. M. C. & Santana, A. P. (2017). Atividade antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contra microrganismos isolados da carne de frango. *Ciência animal brasileira*, 18, 1-7. doi: 10.1590/1089-6891v18e-42254
- Corrêa, J. C. R. & Salgado, H. R. N. (2001). Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 500-506. doi: 10.1590/S1516-05722011000400016.
- Efing, L. C., Caliari, T. K., Nakashima, T. & De Freitas, R. J. S. (2009). Caracterização química e capacidade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 27(2). doi: 10.5380/cep.v27i2.22034.
- Fascina, V. B. (2011). Aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos em dietas de frangos de corte. (Tese de doutorado), Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentão, P., Andrade, P. B., González Álvarez, J. A. & Pereira, J. A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42, 126-132. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.021.
- Ferraz, J. C. B., Matos, C. H. C., Oliveira, C. R. F., Sá, M. G. R. & Conceição, A G C. (2017). Extrato de folhas de juazeiro com atividade acaricida sobre o ácaro-vermelho em algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(7), 493-499. doi: 10.1590/s0100-204x2017000700003.
- Filip, R. M. S., Lotito, S. B., Ferraro, G. M. S. & Fraga, C. G. (2000). Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, 20(10),1437-144. doi: 10.1016/S0271-5317(00)80024-X.
- Flochlay AS, Thomas E, Sparagano O (2017) Poultry red mite (*Dermanyssus 545 gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a 546 significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasit Vectors* 10:357. doi: 10.1186/s13071-017-2292-4.
- Freitas, R. C., Rocha, T. J. M., Azevedo, R. R. D. S., Souza, L. I. O. & Santos, A. F. (2014). Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus*

amboinicus (lour.) e *mentha x villosa* (huds.). *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, 35(1), 113-118. ISSN 1808-4532

Gobbo-Neto, L. & Lopes, N P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374-381. doi: 10.1590/S0100-40422007000200026.

Gonçalves, J. H. T., Santos, A. S. & Moraes, H. A. (2015). Atividade antioxidante, compostos fenólicos e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 13(1), 486-497. doi: 10.5892/ruvrd.v13i1.2003.

Guilarducci, N. V., Araújo, S. G., Pereira, A. F., Ribeiro, R. I. M. A., Dos Santos Lima, L. A. R. & Pinto, F. C. H. (2016). Efeito da administração oral de extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich. *Revista fitos*, 10(1), 23-29. doi: 10.5935/2446-4775.20160003.

Gyawali, R. & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.

Heck, C. I. & De Meija, E. G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science*, 72(9), 138-151. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x

Lima, I. P. A., Alves, R. A. H., Costa, M. R. M., Mendonça, A. K. P., Lima, E. L. F., Langassner, S. M. Z., Dametto, F. R., Lima, K. C. & Lins, R. D. A. (2021). Antimicrobial activity of *Spondias mombin* L. aqueous and hydroethanolic extracts on *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* - an in vitro study. *Research, Society and Development*, 10(1), 1-13. doi: 10.33448/rsd-v10i1.11949.

Loureiro, R. J., Roque, F., Rodrigues, A. T., Herdeiro, M. T. & Ramalheira, E. (2016). O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34(1), 77-84. doi: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003.

Matos, F. J. A. (1997). *Introdução a fitoquímica experimental*. Fortaleza: Edições UFC.

Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F. D. & Aguilar, C N. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1) 445-450. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.07.017.

Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P. & Araujo, E L. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 28(5) 892. doi: 10.1590/S0100-40422005000500029.

Onivogui, G., Letsididi, R., Diaby, M., Wang, L. & Song, Y. (2016). Influence of extraction solvents on antioxidant and antimicrobial activities of the pulp and seed of *Anisophyllea laurina* R. Br. ex Sabine fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 20-25. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.09.023.

Pandini, J. A., Pinto, F. G. S., Scur, M. C., Alves, L. F. A. & Martins, C. C. (2015). Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of medicinal plants research*, 9(3) 48-55. doi: 10.5897/JMPR2014.5551.

Pereira, D. (2011). *Dermanyssus gallinae* em galinhas poedeiras em bateria: Carga parasitária, acção vectorial e ensaio de campo de um biopesticida. (Dissertação de Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa-Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Jimenez, J. P. & Calixto, F. D. S. (2007). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa*, 127,1-4. ISSN 1679-6535.

Santos, A. T. L., Carneiro, J. N. P., Andrade-Pinheiro, J. C., Araújo-Neto, J. B., Sales, D. L., Freitas, M. A., Almeida-Bezerra, J. W. A., Batista, F. L. A., Magalhães, F. E. A., Pereira, C. C. S. S., Torres, M. L. A. L., Lima, E. E., Coutinho, H. D. M. & Morais-Braga, M. F. B. (2020). Antibacterial and antioxidant potential of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) extracts. *Research, Society and Development* 9(12), 1-21. doi: 10.33448/rsd-v9i12.10845.

Scur, M. C., Pinto, F. G. S., Bona, E. A. M., Weber, L. D., Alves, L. F. A. & Moura, A C. (2014). Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates

recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, 9, n.9, p.823-830, 2014. doi: 10.5897/AJAR2013.8202.

Smirnova, G. V., Vysochina, G. I., Muzyka, N. G., Samoilova, Z., Kukushkina, T. A. & Oktabr'skii, O. N. (2009). The antioxidant characteristics of medicinal plant extracts from western Siberia. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45, 638-641. doi: 10.1134/S0003683809060118.

Taketa, A. T. C., Gondorf, M., Breitmaier, E. & Schenkel, E. P. (2002). New triterpene and triterpenoid glycosides from *Ilex brevicuspis*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38 (2), 155-161. doi: 10.1590/S1516-93322002000200004.

Weber, L. D., Pinto, F. G. S., Scur, M. C., Souza, J. G. L., Costa, W. F. & Leite, C W. (2014). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. *African Journal of Agricultural Research*, 9(9), p 846-853. doi: 10.5897/AJAR2013.8260.

Capítulo 2: Caracterização fitoquímica e avaliação de atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de *Ilex brevicuspis* Reissek (Aquifoliaceae) frente a sorotipos de *Salmonella* spp de origem avícola

Phytochemical characterization and evaluation of antibacterial and antioxidante activity of *Ilex brevicuspis* (Aquifoliaceae) Reissek extracts against *Salmonella* spp serotypes of poultry origen

RESUMO

A espécie *Ilex brevicuspis* Reissek é uma planta nativa do sul do Brasil, conhecida popularmente como caúna da serra e pertencente à família Aquifoliaceae. Espécies deste gênero têm despertado interesse, pelo potencial de suas atividades biológicas sobre microrganismos no setor industrial e avícola. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica dos extratos hexânico (EH) e acetônico (EA) de *Ilex brevicuspis*; determinar a atividade antibacteriana frente a dez sorotipos de *Salmonella* spp. de origem avícola e avaliar o potencial antioxidante destes extratos. A presença de metabólitos secundários foi analisada através da observação de mudanças de cor ou reações de formação de precipitados; a atividade antimicrobiana foi determinada pela metodologia da microdiuição em caldo; o potencial antioxidante dos extratos foi determinado pelo método fotolorimétrico *in vitro* por sequestro do radical livre estável DPPH. Quanto à prospecção fitoquímica foram identificados no EH, compostos esteroides e flavonoides, e no EA, triterpenóides, taninos e flavonóides. Os extratos apresentaram atividade antibacteriana frente a todos os sorotipos de *Salmonella* testados, com valores de concentração inibitória mínima / concentração bactericida mínima (CIM/CBM) variando de 200 mg/mL a 12,5 mg/mL. Foi verificada atividade antioxidante acima de 70% na concentração de 15% para ambos os extratos. Portanto, os extratos vegetais de *I. brevicuspis* demonstraram ser uma importante fonte de flavonoides e taninos, com potencial atividade antibacteriana e antioxidante, podendo ser considerado uma alternativa promissora para controle de *Salmonella* no ambiente avícola.

Palavras-chave: CIM; microdiluição; DPPH; bioativos vegetais; metabólitos secundários

ABSTRACT

The species *Ilex brevicuspis* Reissek is a plant native to southern Brazil, popularly known as caúna da serra and belonging to the Aquifoliaceae family. Species of this genus have aroused interest, due to the potential of their biological activities on microorganisms in the industrial and poultry sector. In view of this, the objective of this work was to perform the phytochemical characterization of the hexane (HE) and acetic (AE) extracts of *Ilex brevicuspis*; to determine antibacterial activity against ten serotypes of *Salmonella* spp. of poultry origin and to evaluate the antioxidant potential of these extracts. The presence of secondary metabolites was analyzed by observing color changes or precipitate formation reactions; antimicrobial activity was determined by the broth microdilution methodology; the antioxidant potential of the extracts was determined by the photocolometric method in vitro by sequestering the stable free radical DPPH. As for phytochemical prospecting, steroidal and flavonoid compounds were identified in the HE, and in the AE, triterpenoids, tannins and flavonoids. The extracts showed antibacterial activity against all tested *Salmonella* serotypes, with minimum inhibitory concentration / minimum bactericidal concentration (MIC / MBC) values ranging from 200 mg / mL to 12.5 mg / mL. Antioxidant activity above 70% was found at a concentration of 15% for both extracts. Therefore, *I. brevicuspis* plant extracts proved to be an important source of flavonoids and tannins, with potential antibacterial and antioxidant activity, and can be considered a promising alternative to control *Salmonella* in the poultry environment

Keywords: MIC; microdilution; DPPH; plant bioactive; secondary metabolites

INTRODUÇÃO

A avicultura é um dos setores que mais cresce na última década entre as atividades voltadas para a produção animal. O Brasil ocupa posição de destaque, sendo atualmente o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango, com 13,25 milhões de toneladas do produto ao ano, além de produzir cerca de 49 bilhões de ovos (ABPA, 2020). Isso implica em atender as exigências do mercado consumidor no quesito de sanidade avícola e qualidade dos alimentos (KOTTWITZ et al., 2008).

Devido a esse crescimento rápido do setor avícola, passaram a ser incorporados produtos antimicrobianos e antioxidantes na ração das aves, pois, além de serem utilizados para o tratamento ou prevenção de doenças, também são utilizados no incremento da produção animal, como promotores de crescimento, pois, melhoram o desempenho do animal fazendo com que ganhe peso rapidamente, diminuindo assim, o tempo de produção de frangos, até que atinjam o ponto de abate (RIZZO et al., 2010). Com o elevado adensamento das aves nos criadouros, houve também um aumento significativo no número de casos de salmonelose, sendo esta a principal zoonose encontrada em ambiente avícola. A bactéria *Salmonella* spp. pode ser transmitida através do consumo de produtos avícolas, sendo uma das maiores preocupações de saúde pública, por causar doenças como gastroenterites e febre tifoide. Além disto, proporciona um grande impacto na cadeia avícola, uma vez que a contaminação de um lote pode ser facilmente transmitida para outras aves saudáveis (ANSARI et al., 2017; NIRMALA et al., 2018).

A utilização de antibióticos e antioxidantes sintéticos no enfrentamento desses problemas tem sido a prática comum na indústria de alimentação animal e humana. Entretanto, os rigores cada vez maiores das regulamentações internacionais e mesmo nacionais, que proíbem ou restringem a utilização de aditivos sintéticos na produção alimentícia, e a conscientização crescente dos consumidores, em decorrência das mudanças nos contextos socioeconômicos e culturais, têm aumentado progressivamente a demanda por produtos mais naturais e que tendem a oferecer menores riscos à saúde.

Nesse sentido, a utilização de produtos de origem vegetal, tais como extratos vegetais têm demonstrado ser promissora, com a vantagem de, não deixar resíduos no ambiente ou alimento e, frequentemente, apresentarem baixa toxicidade a mamíferos (VIEIRA, et al. 2001).

Devido a esses problemas e com o aumento da preocupação da população em relação ao uso de produtos sintéticos, há uma demanda nos estudos em relação a atividades biológicas de produtos alternativos para se descobrir potenciais atividades antimicrobianas e antioxidantes que possam ser usados para controlar crescimento de patógenos como a *Salmonella* e em substituição aos antioxidantes sintéticos na indústria.

Nesse contexto é de grande importância avaliar atividades biológicas oriundas de produtos naturais, dentre eles extratos vegetais de plantas nativas, como é o caso de *Ilex brevicuspis* Reissek, pertencente à família Aquifoliaceae, que apresenta 600 espécies e é distribuída em um único gênero *Ilex*, das quais cerca de 60 ocorrem no Brasil. Uma das mais importantes plantas desse gênero, é *Ilex paraguasiensis* que apresenta diversas propriedades biológicas reconhecidas, como atividade antioxidante, antiobesidade e atividade antimicrobiana (ARÇARI et al., 2009;BONA et al., 2010), porém a espécie *Ilex brevicuspis* não apresenta relato de suas atividades na literatura.

Sendo assim, o presente estudo objetivou realizar a caracterização fitoquímica dos extratos hexânico (EH) e acetônico (EA) das folhas de *I. brevicuspis*, bem como investigar as atividades antimicrobiana e antioxidante frente a diferentes sorotipos de *Salmonella* spp avícola.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI), situado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. As folhas para o preparo dos extratos foram coletadas no Parque Ecológico Paulo Gorski, (24° 57'51" S 53° 26'2"W) situado na cidade de Cascavel, Paraná, Brasil. Uma exsicata da planta foi entregue ao Herbário UNOP para a identificação botânica e o registro do exemplar *voucher* UNOP 8924.

OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para o preparo dos extratos, seguindo a metodologia de Weber et al., (2014), as folhas coletadas foram secas em estufa de circulação de ar, por aproximadamente 24 horas e moídas em moinho de facas do tipo Willey, com granulometria de 0,42 mm para a obtenção do pó. Foram adicionadas 10 gramas do pó em 100 mL dos solventes, acetona P.A. e hexano P.A., sendo essa mistura mantida em agitador rotativo a 150 rpm por 24 horas. Após esse período, a mistura foi submetida à filtração a vácuo e, posteriormente, a centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. Para finalizar o material foi submetido à rotaevaporação para a total retirada do solvente. O extrato bruto, produzido ao final, foi acondicionado em recipientes de vidro e armazenados a 4°C ao abrigo da luz. O rendimento dos extratos vegetais foi calculado pela expressão: Porcentagem (%) = (massa do extrato (g) / massa vegetal seca e moída (g) X 100.

ANÁLISE FITOQUÍMICA

A identificação dos compostos presentes nos extratos foi realizada segundo metodologia descrita por Matos (1997) com modificações, de forma a se detectar a provável presença de alcalóides, saponinas, esteróides, triterpenóides, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, taninos e cumarinas.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)/ CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para a atividade antimicrobiana foram testados 10 sorotipos de *Salmonella* spp. de maior ocorrência na região Oeste do Paraná, Brasil, isoladas de aviários de frango de corte da região, sendo: *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Gallinarum*, *S. Mbandaka*, *S. Give*, *S. Saintpaul*, *S. Orion* e *S. Agona*, cedidos por um laboratório veterinário de Cascavel, Paraná, Brasil.

O teste para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2015) e SCUR et al. (2014), sendo realizadas a partir do método de microdiluição em caldo e foi utilizada placas de 96 poços. Para a determinação da CIM foram adicionados 150 µL de caldo Müller-Hinton (MH) em todos os poços, 150 µL dos extratos vegetais foi acrescentado no primeiro poço, com diluições seriadas que variaram de 200 até 0,09 mg/mL. Após as

diluições, foram distribuídas alíquotas de 10 µl com sorotipos de *Salmonella* a 1×10^5 UFC/mL em cada poço e as placas foram incubadas a 36°C durante 24 horas. Como controle positivo foram realizadas diluições seriadas do antibiótico gentamicina, nas mesmas concentrações do extrato, e também adicionado 10 µl do inóculo bacteriano. Depois da incubação foi observada a turbidez e cada poço recebeu uma alíquota de 10 µl de cloreto de trifenil tetrazólio (TTC) para a revelação da inibição ou não das bactérias. Após a realização do ensaio da CIM, antes de realizar a adição de TTC, foi retirada uma alíquota de 2 µl e inoculada em Mueller-Hinton Ágar, para a determinação da CBM e as placas foram incubadas durante 24 horas a temperatura de 36° C, observando o crescimento ou não bacteriano. A atividade dos extratos foi classificada de acordo com Pandini et al. (2015) sendo os extratos com atividade alta ($<12,5 \text{ mg/mL}^{-1}$), moderada ($12,5 \text{ a } 25 \text{ mg/mL}^{-1}$), baixa ($50 \text{ a } 100 \text{ mg/mL}^{-1}$) e muito baixa ($>100 \text{ mg/mL}^{-1}$).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos hexânico (EH) e acetônico (EA) foi analisada de acordo com a metodologia proposta por Rufino et al. (2007) e Weber et al. (2014), baseadas na redução do radical livre DPPH. Uma alíquota de 0,1 mL dos extratos foi adicionada a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 0,2m. As amostras foram mensuradas em espectrofotômetro com absorvância de 515 nm. Como controle negativo foi utilizado 0,1 mL de solução controle de metanol e para controle positivo foi utilizado o antioxidante butil-hidroxi-tolueno (BHT). Os testes foram realizados em triplicata. O cálculo da capacidade de sequestro do radical livre foi expressa por: I%: $[(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1/\text{Abs}_0) \times 100]$, sendo Abs0 é a absorvância do controle e Abs1 é a absorvância da amostra. Para o cálculo de IC₅₀ (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH), foram utilizadas as concentrações dos extratos vegetais e do BHT para obter a equação da reta com R² maior que 0,80, e assim, encontrar o valor de IC₅₀, a partir de regressão linear. Os testes foram realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. Os resultados de IC₅₀ foram analisados usando ANOVA com teste de Tukey (p <0,05) utilizando o programa estatístico R® versão 3.3.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento dos extratos vegetais foi de 11,75% para EA e 5% para EH. Diversos fatores são capazes de influenciar o rendimento dos extratos vegetais, tais como o método extrativo, temperatura utilizada, tempo de extração (FRANZEN et al., 2018) e principalmente, a seleção do solvente, sendo que sua polaridade e solubilidade influenciam diretamente sobre o rendimento dos mesmos (CABANA et al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013).

De acordo com a prospecção fotoquímica dos extratos foi identificada a presença dos compostos pertencentes classe dos esteroides triterpenóides e livres, flavonas, flavanóides, xantonas e taninos. Os esteroides livres foi a única classe de metabólitos secundários presentes em todos os extratos. O extrato que apresentou a maior diversidade de metabólitos secundários foi o EH, sendo identificados esteroides e compostos do grupo flavonoides, como flavonas, xantonas e flavanóides. Já no EA foi verificada a presença de esteroides e taninos (Tabela 1).

Tabela 1. Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais foliares de acetona e hexano de *I. brevicuspis*.

Metabólitos secundários	EA	EH
Saponinas	-	-
Esteróides triterpenoides	+	-
Esteróides livres	+	+
Triterpenoides	-	-
Alcaloides	-	-
Antocianinas	-	-
Antocianidinas	-	-
Flavonas	-	+
Flavanóides	-	+
Xantonas	-	+

Chalconas	-	-
Auronas	-	-
Flavanonas	-	-
Taninos condensados	+	-
Cumarinas	-	-

(+) presença; (-) ausência. EA= extrato acetona; EH= extrato hexano. Fonte: autores

O método mais comumente utilizado para a extração de compostos em extratos vegetais é através de solventes ou misturas de solventes. A literatura relata que os mais utilizados e recomendados na extração de metabólitos são metanol, etanol, acetona e hexano (CABANA et al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013; SILVA et al., 2010).

Dentro do gênero *Ilex*, as classes de metabólitos secundários mais relatadas são xantinas, saponinas e os compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides (FILIP et al., 2000; COSTA et al., 2017). Taketa et al. (2002) isolaram triterpenos e saponinas das folhas de *I. brevicuspis*, sendo encontrados derivados de acetil, derivados de peracetil e saponinas livres. Embora nossos estudos também sejam com essa espécie, existem diferenças nos compostos encontrados em ambas as pesquisas, devido provavelmente aos fatores ambientais, tais como: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, ritmo circadiano, poluição atmosférica e proteção contra patógenos, que pode afetar a via metabólica e, conseqüentemente, influenciar nos compostos produzidos pela planta (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Em relação à atividade antimicrobiana, observou-se que os extratos apresentaram variações de acordo com o solvente extrator e o microrganismo testado. O EH, apresentou as melhores atividades antimicrobianas demonstrando uma atividade moderada, segundo a classificação de Pandini et al (2015). Os sorotipos mais suscetíveis a esses extratos foram *S. Santpaul*, *S. Give* e *S. Typhimurium* com CIM de 12,5 mg/mL e a CBM de 25 mg/mL. Já o EA, apresentou uma atividade baixa, sendo que os valores de CIM variaram de 25 mg/mL a 100 mg/mL, e os valores de CBM foram de 200 mg/mL para todos os sorotipos, exceto para *S. Gallinarium*, que foi somente inibida por esse extrato (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos foliares acetônico (EA) e hexânico (EH) das folhas de *I. brevicuspis* frente sorotipos de *Salmonella* spp.

Microrganismos	EA (CIM / CBM mg/mL)	EH (CIM / CBM mg/mL)
S. Agona	25/200	25/50
S. Santpaul	25/200	12,5/25
S. Heidelberg	50/200	50/100
S. Orion	50/200	25/50
S. Give	50/200	12,5/25
S. Gallinarium	50/-	25/50
S. Mbandaka	100/200	12,5/50
S. Infantis	50/200	50/200
S. Typhimurium	100/200	12,5/25
S. Enteritidis	50/200	50/200

(-) Sem atividade. EA= extrato acetona; EH= extrato hexano. Fonte autores

Não foram encontrados estudos referentes à atividade antimicrobiana de *I. brevicuspis*, porém, De Bona et al. (2010) relataram atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *I. paraguarienses* frente a 14 sorotipos de *Salmonella*, dentre eles, *S. Orion*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis* e *S. Mbandaka*, sorotipos que também foram analisados em nosso estudo. Os valores de inibição variaram de 150 mg/mL a 200 mg/mL, o que corrobora com os nossos resultados.

Outra pesquisa avaliou a atividade antimicrobiana por meio de disco difusão dos extratos aquoso e etanólico de *I. paraguariensis* frente a cepas de *E. coli* e *P. mirabilis* isoladas de carne de frango. Os extratos apresentaram inibição sobre cepas testadas na

concentração de 400mg/mL (COSTA et al., 2017), vale salientar que assim como *Salmonella*, ambas as bactérias desse estudo são Gram-negativas e apresentam parede bacteriana mais complexa quando comparadas as bactérias Gram-positivas.

Devido às possíveis propriedades antimicrobianas dos metabólitos secundários em plantas, sugere-se que o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais de *I. brevicuspis* esteja relacionado aos componentes de seu perfil fitoquímico. Esses compostos podem estar ligados diretamente à ação antimicrobiana dos extratos, visto que os flavonoides, encontrados no EH, atuam na membrana plasmática e na parede bacteriana, causando rupturas e, conseqüentemente, diminuindo a fluidez, além de inibir a síntese de ácidos nucleicos e o metabolismo energético (SAMY & GOPALAKRISHNAKONE, 2010; CUSHNIE & LAMB, 2011). Além disso, os taninos encontrados no extrato de acetona são adstringentes e capazes de precipitar proteínas, o que causa um efeito antimicrobiano e antifúngico (MONTEIRO et al., 2005).

Os resultados da atividade antioxidante foram ensaiados pela técnica de sequestro de radical livre (DPPH). Esse ensaio trata-se de um método direto e confiável para medir a capacidade anti-radical de extratos vegetais (CABANA et al., 2013). Os melhores resultados da atividade antioxidante foram apresentados pelo EA a 20 mg/mL obtendo um potencial de 82,67% e IC₅₀ 8,29±0,05 (Tabela 3, Tabela 4). Já para o EH, a maior atividade antioxidante foi observada a 25 mg/mL apresentando potencial de 82,45% e IC₅₀ 11,29±0,03. Em ambos os EH (25 mg/mL) e EA (20 mg/mL), os melhores resultados foram observados nas maiores concentrações analisadas. O controle utilizando BHT apresentou 98,57% de atividade na concentração padrão e IC₅₀ 0,26±0,006.

Tabela 3. Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos foliares acetônico (EA) e hexânico (EH) de *I. brevicuspis* por sequestro do radical DPPH.

Concentração (mg/mL)	Controle BHT	EA	EH
25	-	-	82,45±0,49
20	-	82,67±0,41	79,72±0,66

15	-	71,58±1,32	70,10±0,62
10	-	61,53±0,68	46,44±1,25
5	-	43,66±2,13	33,49±0,84
2,5		33,49±0,73	20,27±0,66
1	98,57±0,54	20,54±0,73	-
0,5	77,32±0,67	-	-
0,25	54,46±4,69	-	-
0,1	37,85±2,99	-	-
0,05	22,50±3,19	-	-
0,025	10,17±1,65		

(-) não testado; média ± desvio padrão. EA= extrato acetônico; EH= extrato hexânico.
Fonte: autores

Tabela 4. Valor de IC₅₀ pelo ensaio do DPPH dos extratos vegetais foliares acetônico (EA) e hexânico (EH) de *I. brevicuspis*.

Amostras	IC ₅₀ (mg/mL)	Equação	R ²
BHT	0,26±0,006	y = 75,471x + 29,535	0,9216
EA	8,29±0,05	y = 3,1433x + 23,938	0,9524
EH	11,29±0,03	y = 2,7772x + 18,619	0,9402

média ± desvio padrão. EA= extrato acetônico; EH= extrato hexânico. Fonte: autores

O efeito sequestrador de radicais livres dos extratos foi considerado dependente da concentração, e de modo geral, foi verificado que os extratos necessitam

concentrações maiores para alcançar o máximo de potencial antioxidante quando comparado ao controle BHT. Contudo, tanto o EA quanto EH apresentaram porcentagem de sequestro de DPPH acima de 80% (Tabela 3).

Além do DPPH, já foram relatadas as atividades antioxidantes dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*, *I. pseudobuxus*, *I. argentina*, *I. dumosa*, *I. theezans*, a partir do método de oxidação de lipossomos oxidados por dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH), apresentando aproximadamente 95%, 95%, 90%, 40% e 30% de atividade, respectivamente, além disso os extratos também apresentaram compostos fenólicos na sua composição (FILIPPI et al., 2000). A distribuição desses compostos nas plantas está atribuída a diversos fatores e sua ação é de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, pois apresentam propriedades capazes de realizar absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Não foram encontrados outros estudos de *I. brevicuspis* na literatura, porém, Schinella et al. (2000) verificaram a atividade antioxidante de *I. paraguariensis* por diversos métodos, dentre eles o método de sequestro de DPPH, que demonstrou 90% de atividade antioxidante quando avaliada a 0,5 mg/mL.

Dessa forma, foi verificado o importante papel dos solventes na determinação das atividades biológicas, como a atividade antioxidante e antimicrobiana, além de suas características determinantes na extração de compostos bioativos. Estudos relacionados à atividade antioxidante de produtos naturais têm sido cada vez mais enfatizada com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos que podem ser prejudiciais a saúde da população.

Nesse estudo, ambos os solventes acetona e hexano, apresentam características apolares, o que confere a eles características semelhantes em relação às atividades biológicas e aos componentes extraídos. No caso dos taninos, sua habilidade de se ligar a proteínas ou outras macromoléculas e sua capacidade de se complexar a íons metálicos está atribuída à alta atividade biológica de plantas que contém esse composto (MONTEIRO et al., 2005).

CONCLUSÕES

A partir da prospecção fitoquímica dos EA e EH das folhas de *I. brevicuspis* foi identificada a presença de esteróides, flavonóides, flavonas, xantonas e taninos. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os sorotipos de *Salmonella* spp. Foi verificada atividade antioxidante acima de 70% na concentração de 15% para ambos os extratos e acima de 82% nas concentrações mais elevadas. As bioatividades demonstradas devem estar relacionadas aos compostos do metabolismo secundário presente nos extratos e com comprovada ação sobre os organismos avaliados. Os resultados revelam a importância de estudos para compreender o potencial e a ação de extratos vegetais, e sua possível utilização como alternativa para substituir o uso extensivo de antimicrobianos e antioxidantes sintéticos na cadeia avícola, com o intuito de diminuir os impactos causados também ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal Relatório anual de 2020. Disponível em: [http:// https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2020.pdf](https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2020.pdf). Acesso em: 04/02/2020. 20:30.

ANSARI, F.; POURJAFAR, H.; BOKAIE, S.; PEIGHAMBARI, S. M.; MAHMOUDI, M.; FALLAH, M. H.; TEHRANI, F.; RAJAB, A.; GHAFOURI, S. A.; SHABANI, M. Association between poultry density and *Salmonella* infection in commercial laying flocks in Iran using a kernel density. **Pakistan Veterinary Journal**, v.3, n.37, p.299-304, 2017.

ARÇARI, D. P.; BARTHCHEWSKY, W.; SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; SOUZA, M.F.F.; SAAD, M.J.; BASTOS, D.H.M.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 17, n. 12, p. 2127–2133, 14 dez. 2009.

CABANA, R.; SILVA, L.R.; VALENTAO, P.; VITURRO, C.I.; ANDRADE, P.B. Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v.48, p.49-56, 2013.

CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), [S. l.], v. 35, n. 2, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3>

COSTA, D.E.M.; RACANICCI, A.M.C.; SANTANA, A.P. Atividade antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contra microrganismos isolados da carne de frango. **Ciência Animal Brasileira**, v.18, p.1-7, 2017.

CUSHNIE, T. P. T; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, p.99-107, 2011.

DE BONA, E.A.M.; PINTO, F.G.S; BORGES, A.M.C.; WEBER, L.D.; FRUET, T.K.; ALVES, L.F.A.; MOURA, A.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n.3, p.45-48, 2010.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A.; PEREIRA, E.; FREIRE, M.S.; VALENTÃO, P., ANDRADE, P.B.; GONZÁLEZ ÁLVAREZ, J.A.; PEREIRA, J.A. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.126–132, 2013.

FILIP, R.M.S.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.M.S.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v.20, n.10, p.1437-144, 2000.

FRAZEN, F. L.; FRIES, L. L. M.; DE OLIVEIRA, M. S. R.; LIDÓRIO, H. F.; MENEGAES, J. F.; LOPES, S. J. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. **Acta Iguazu**, v. 7, n. 1, p. 9-21, 2018.

GOBBO-NETTO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GONÇALVES, J.H.T.; SANTOS, A.S.; MORAIS, H.A. Atividade antioxidante, compostos fenólicos e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.13, n.1, p.486-497, 2015.

KOTTWITZ, L.B.M.; BACK, A.; LEÃO, J.A.; ALCOCER, I.; KARAN, M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** [online], v.60, n.2, p.496-498, 2008.

MATOS, F.J.A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAUJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

NIRMALA, T.V.; REDDY, A.D.; SREE, E.K.; SUBBAIAH, K.V.; RAJU, G.S.; REDDY, R.V.S.K. Salmonellosis in Poultry: a case report. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.7, n.2, p.2347-2349, 2018.

PANDINI, J.A.; PINTO, F.G.S.; SCUR, M.C.; ALVES, L.F.A.; MARTINS, C.C. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.9, n.3, p.48-55, 2015.

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.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa**, v.127, p.1-4, 2007.

SAMY, R.P., GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, p.283–294, 2010.

SARTORATTO, A. ; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of

essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** [online], v.35, n.4, p.275-280, 2004.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCUR, M.C.; PINTO, F.G.S.; BONA, E.A.M.; WEBER, L.D.; ALVES, L.F.A.; MOURA, A.C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. **African Journal of Agricultural Research** [online], v.9, n.9, p.823-830, 2014.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Composto fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos naturais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.669-681, 2010.

TAKETA, A.T.C.; GONDORF, M.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E.P. New triterpene and triterpenoid glycosides from *Ilex brevicuspis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.2, p.155-161, 2002.

Vieira PC, Mafezoli J, Biavatti MW (2001) Inseticidas de origem vegetal. In: 669 Ferreira, J. T. B., Corrêa, A. G., Vieira, P. C. Produtos naturais no controle de 670 insetos. Ed. da UFSCar, São Carlos, pp176.

WEBER, L.D.; SCUR, M.C.; SOUZA, J.G.L.; TOLEDO, A.G.; PINTO, F.G.S. Antimicrobial activity and phytochemical prospection of vegetal extracts of *Ocotea silvestris* Vattimo-Gil and *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) against serotypes of *Salmonella* of poultry origin. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 19, n. 1, p. 116-124, 2018.

WEBER, L.D.; PINTO, F.G.S.; SCUR, M.C.; SOUZA, J.G.L.; COSTA, W.F.; LEITE C.W. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. **African Journal of Agricultural Research** [online], v.9, n.9, p.846-853, 2014.