

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

MAYARA CAMILA SCUR

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO  
ESSENCIAL E EXTRATOS VEGETAIS DE *Psidium cattleianum* SABINE

CASCADEL-PR

Junho/2014

MAYARA CAMILA SCUR

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO  
ESSENCIAL E EXTRATOS VEGETAIS DE *Psidium cattleianum* SABINE

Dissertação apresentado 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: Conservação e Manejo de Recursos  
Naturais

Orientador: Fabiana Gisele da Silva Pinto

CASCADEL-PR

Junho/2014

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

**Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362**

S442c Scur, Mayara Camila  
Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e extratos vegetais de *Psidium cattleianum* Sabine. / Mayara Camila Scur — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2014.  
54 p.

Orientadora: Profa. Dr. Fabiana Gisele da Silva Pinto  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Energia na Agricultura, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.  
Bibliografia.

1. Desinfetantes. 2. Produtos naturais. 3. Antimicrobianos. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21°ed. 630

## FOLHA DE APROVAÇÃO

É preciso amar as pessoas como se não houvesse amanhã, porque se você parar para pensar,  
na verdade não há.

Renato Russo

## AGRADECIMENTOS

Não sei se sou capaz de conseguir de alguma forma, colocar em ordem justa os meus agradecimentos. Não tenho certeza da ordem de “maior” mérito daquilo que conquisto. Sei que parece estranho, mas agradeço muito a mim, por ter conseguido perseverar diante das dificuldades que hoje, depois que passou, parecem tão pequenas. Agradeço aos meus pais pelos exemplos e ambiente familiar saudável e muitíssimo bem humorado que me proporcionaram durante toda a vida, pois sei que meu caráter e minha força é resultado de vocês. Não sei qual das irmãs agradeço mais, uma por ter sido tão protetora na infância ou a outra que me protege hoje e tem influência direta sobre a minha visão de mundo. Não sei se quem tem mais mérito é minha orientadora, que, além de me orientar nos trabalhos, sempre foi franca e me deu conselhos valiosos para a vida pessoal também (quando me bate o desespero, lembro que você disse que o mercado seleciona quem realmente merece). Não sei se são meus amigos de laboratório, que fizeram eu me sentir em casa por tanto tempo: Eliana, Thomas, Laís, Ana, Marina, Boni (especialmente vocês, amo muito), Daian, Jéssica, Clau, Camila, Juliete, Tayana, Lilian, Karin, Amanda e Rafaela, eu realmente tenho muita gratidão por ter me formado ao lado de vocês. Não sei se quem tem mais mérito é um tal senhor Eduardo que me suportou insuportável, você realmente fez tudo que poderia ter sido tão ruim, muito mais fácil, amo muito você meu marido!. Talvez seja por ter ao meu lado pessoas pelas quais torcem muito por mim e que fazem eu me sentir rodeada de sentimentos bons (Tássia, Lucas, Bruna, Gisele, Patricia, Jacqueline, Gustavo, Rodrigo, Juzinha, Veroni, Ivani). Eu só tenho uma certeza, quem quer que tenha cruzado meu caminho, estejam no passado ou no presente, me feito sorrir ou chorar, eu agradeço, pois se qualquer coisa tivesse sido diferente, eu poderia não estar aqui.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO.....   | 8  |
| ABSTRACT .....  | 9  |
| CAPÍTULO 1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E<br>DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS DE <i>Psidium cattleianum</i> SABINE..... | 10 |
| RESUMO.....   | 10 |
| ABSTRACT .....  | 11 |
| INTRODUCTION .....  | 12 |
| MATERIAL AND METHOD.....  | 14 |
| Plant material .....  | 14 |
| Obtaining aqueous extract (AQ).....   | 14 |
| Obtaining ethanolic extract (ET) .....  | 14 |
| Phytochemical screening of plant extracts .....   | 15 |
| Essential oil extraction.....   | 15 |
| Analysis of the chemical composition of the essential oil.....  | 15 |
| GC-MS.....  | 15 |
| Microorganisms .....  | 16 |
| Determination of minimum inhibitory concentration.....  | 16 |
| Essential oil.....  | 16 |
| Plant extracts.....   | 17 |
| Determination of the minimum bactericidal and fungicidal concentrations .....   | 17 |
| Antioxidant activity .....  | 18 |
| Statistical analysis.....   | 18 |
| RESULTS AND DISCUSSION .....  | 19 |
| CONCLUSION.....   | 27 |
| REFERENCES .....  | 28 |
| COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO À REVISTA.....   | 40 |
| CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO IN VITRO DE DESINFETANTES FRENTE A SOROTIPOS DE<br><i>Salmonella</i> ISOLADOS DE GRANJAS AVÍCOLAS .....                     | 41 |
| RESUMO .....  | 41 |
| INTRODUÇÃO.....   | 42 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 44 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 46 |
| CONCLUSÃO.....  | 51 |
| REFERÊNCIAS .....   | 52 |

## RESUMO

A constante busca por produtos antimicrobianos naturais em substituição aos produtos sintéticos tem aumentado nas últimas décadas, devido a principalmente o uso indiscriminado dos antimicrobianos sintéticos convencionais, acarretando na seleção de micro-organismos resistentes. Além disso, existe uma exigência de uma parcela dos consumidores que almejam produtos que não prejudiquem o meio ambiente. Com isso, os desinfetantes biodegradáveis, extratos vegetais e óleos essenciais ganham destaque em pesquisas que visem o controle de patógenos. Para tanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de desinfetantes comerciais (ênfatizando-se os biodegradáveis), como também avaliar extratos vegetais e óleo essencial de *Psidium cattleianum* quanto ao potencial antimicrobiano, antioxidante e caracterização fitoquímica dos mesmos. Para tanto, os desinfetantes foram testados frente a cepas de *Salmonella* isoladas do ambiente avícola, enquanto os extratos vegetais e óleo essencial utilizando-se a metodologia de microdiluição em caldo frente a cepas padrão. Quanto aos desinfetantes, os ácidos orgânicos, ácido peracético, glutaraldeído e amônia quaternária foram os mais eficazes frente aos sorotipos de *Salmonella* na ausência de matéria orgânica, enquanto os ácidos orgânicos apresentou o melhor desempenho na presença de matéria orgânica. Quanto ao estudo fitoquímico de *P. cattleianum*, foram encontradas a presença de flavonóides, terpenóides e taninos nos extratos vegetais aquoso e etanólico, enquanto o óleo essencial apresentou como compostos majoritários o  $\alpha$ -copaene, eucaliptol,  $\delta$ -cadinene e  $\alpha$ -selinene, respectivamente. Em relação à atividade antimicrobiana, os micro-organismos se mostraram suscetíveis quando avaliados frente aos extratos vegetais aquoso e etanólico, assim como frente ao óleo essencial (embora este em maior concentração), demonstrando potencial antimicrobiano da *P. cattleianum*. Quanto à atividade antioxidante, os extratos etanólico e aquoso expressaram valores significativos comparáveis a antioxidantes sintéticos, enquanto o óleo essencial não apresentou atividade antioxidante.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desinfetantes, Produtos Naturais, antimicrobianos.



## **ABSTRACT**

The constant search for natural antimicrobial products in substitution of synthetics, has increased in recent decades, mainly due to the indiscriminate use of conventional synthetic antimicrobials, resulting in the selection of resistant micro-organisms. In addition, there is a requirement of a share of consumers who demand products that do not harm the environment. Therewith, biodegradable disinfectants, plant extracts and essential oils are highlighted in studies that aim to control pathogens. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of commercial disinfectants (emphasizing biodegradable), but also evaluate plant extracts and essential oil of *Psidium cattleianum* regarding potential antimicrobial, antioxidant and phytochemical characterization of them. To do so, disinfectants against strains of *Salmonella*, isolated from poultry environment, were tested, while plant extracts and essential oil using the broth microdilution methodology against standard strains. Regarding disinfectants, organic acid, peracetic acid, glutaraldehyde and quaternary ammonium were the most effective against *Salmonella* serotypes in the absence of organic matter, while the organic acids showed the best performance in the presence of organic matter. As to the phytochemical study of *P. cattleianum*, flavonoids, terpenoids and tannins in aqueous and ethanolic were found in the aqueous plant extract, while the essential oil presented as the major compounds  $\alpha$ -copaene, eucalyptol,  $\delta$ -cadinene and  $\alpha$ -selinene respectively. Regarding antimicrobial activity, microorganisms have proved susceptible when evaluated against aqueous and ethanolic plant extracts, also to the essential oil (although this on higher concentration), demonstrating its antimicrobial potential of *P. cattleianum*. For antioxidant activity, the ethanolic and aqueous extracts had significant values comparable to synthetic antioxidants, while the essential oil showed no antioxidant activity.

**KEY WORDS:** Disinfectants, Natural Products, Antimicrobial.

## **Capítulo 1. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e diferentes extratos vegetais de *Psidium cattleianum* Sabine**

### **Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine**

Mayara Camila Scur<sup>1</sup>; Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>2</sup>; Willian Ferreira da Costa<sup>3</sup>; Camila Wihby Leite<sup>3</sup>;  
Lívia Godinho Temponi<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Aluna do programa de Pós Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR.

<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR.

<sup>3</sup> Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR.

<sup>4</sup> Laboratório de Botânica – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – PR.

### **Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e diferentes extratos vegetais de *Psidium cattleianum* Sabine**

#### **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos vegetais aquoso e etanólico de *Psidium cattleianum* Sabine frente à bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e levedura, a atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos vegetais, a composição química do óleo essencial *P. cattleianum* e a triagem fitoquímica dos extratos vegetais aquoso e etanólico da mesma planta. A determinação da atividade antimicrobiana foi definida por meio dos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC), utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, a atividade antioxidante determinada pelo método de captura de radicais livres

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A composição fitoquímica do óleo essencial foi realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), a triagem fitoquímica por meio de testes da presença de classes de metabólitos secundários. Quanto à atividade antimicrobiana, o extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana moderada frente as bactérias *K. pneumoniae* e *S. epidermidis*, enquanto frente aos demais micro-organismos apresentou atividade considerada fraca. O extrato aquoso e o óleo essencial apresentaram atividade considerada fraca, embora tenham inibido o crescimento dos micro-organismos. Em relação ao potencial antioxidante, os extratos etanólico e aquoso apresentaram índice de sequestro superior a 90%, enquanto o óleo essencial não apresentou atividade antioxidante significativa, considerando os valores de IC50. Assim, fica estabelecida a capacidade antimicrobiana e antioxidante dos extratos vegetais e óleo essencial testados. Para a composição fitoquímica, a maior classe de compostos voláteis identificados no óleo essencial de *P. cattleianum* foram os hidrocarbonetos terpênicos, sendo eles:  $\alpha$ -copaene (22%), eucaliptol (15%),  $\delta$ -cadinene (9,63%) e  $\alpha$ -selinene (6,5%). Na triagem fitoquímica dos extratos verificou-se a presença de taninos, flavonóides e triterpenos tanto para o extrato aquoso quanto etanólico.

**Palavras-chave:** *Psidium cattleianum*, ação antimicrobiana, microdiluição, CG/MS, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

The goals of the study were to determine: the antimicrobial activity of the essential oil and aqueous and ethanolic plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine against gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and yeast; the antioxidant activity of essential oils and plant extracts; the chemical composition of the essential oil of *P. cattleianum*; and the phytochemical screening of aqueous and ethanolic plant extracts of the same plant. The determination of the antimicrobial activity was defined by means of the values of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration, using the broth

microdilution method. The antioxidant activity was determined using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method. The phytochemical composition of the essential oil was assessed through gas chromatography-mass spectrometry, and the phytochemical screening was assessed by testing the presence of classes of secondary metabolites. Regarding the antimicrobial activity, the ethanolic extract exhibited moderate antimicrobial activity with respect to bacteria *K. pneumoniae* and *S. epidermidis*, whereas, regarding other microorganisms, it showed activity considered weak. The aqueous extract and the essential oil showed activity considered weak, although they inhibited the growth of microorganisms. With respect to the antioxidant potential, the ethanolic and aqueous extracts exhibited a scavenging index exceeding 90%, whereas the essential oil did not show significant antioxidant activity considering the IC<sub>50</sub> values. This way, the antimicrobial and antioxidant capacity of plant extracts and the essential oil tested was confirmed. Regarding the phytochemical composition, the largest class of volatile compounds identified in the essential oil of *P. cattleianum* included the following terpenic hydrocarbons:  $\alpha$ -copaene (22%): eucalyptol (15%),  $\delta$ -cadinene (9.63%); and  $\alpha$ -selinene (6.5%). The phytochemical screening of extracts showed the presence of tannins, flavonoids, and triterpenoids for aqueous and ethanolic extracts with respect to the pathogens tested.

**Keywords:** *Psidium cattleianum*, antimicrobial action, microdilution, GC-MS, antioxidant activity.

## INTRODUCTION

The search for products of natural origin with pharmacological properties has contributed significantly to the discovery of new substances with important uses (Sousa et al., 2008). In this sense, Brazil stands out as a potential source of these natural products for having the largest plant biodiversity on the planet and also because most of its plants are unexplored with respect to their pharmacological potential (Pinto et al., 2002).

Since the inadequate and indiscriminate use of synthetic antimicrobials is leading to the selection of multi-resistant strains, the antimicrobial potential of plant extracts and essential oils are intended to delay this process through the emergence of new antimicrobial substances (Arya et al., 2010). In addition to the antimicrobial potential, the fact that some synthetic antioxidants widely used in the food industry can lead to the development of tumor cells has led to increased demand for similar products of natural origin, among which essential oils and plant extracts that have phenolic compounds in their composition stand out for their important antioxidant activity (Sacchetti et al., 2005).

The Myrtaceae family consists of approximately 3,800 species and 130 genera distributed worldwide (Lucas et al., 2005). In Brazil, this family is represented by about 1,000 species and 26 genera (Sobral et al., 2010) including many which are used due to their medicinal properties and importance as food sources (Agra et al., 2008). The genus *Psidium* has approximately 92 species distributed from Mexico and the Caribbean to Uruguay and northern Argentina. In Brazil, it occurs from the Amazon region to the State of Rio Grande do Sul (Landrum, 2003). Among the species of the genus *Psidium*, *Psidium cattleianum* Sabine stands out for the commercial importance attributed to its fruit used in the food industry (Santos et al., 2007). However, although there are studies on the quality of its seeds (Silva et al., 2011), the antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from its fruit (Medina et al., 2011), the chemical characteristics of its juice (Santos et al., 2007), and the chemical composition of the essential oil (Marques et al., 2008; Tucker et al., 1995), there are no reports about the antimicrobial and antioxidant potential of extracts obtained from the leaves and essential oil of *P. cattleianum*, nor are there on the phytochemical composition regarding its biological activities. The present study is the first report on the subject.

On the basis of the above, the goals of the present study were: to assess the antimicrobial potential of essential oil and plant extracts of *P. cattleianum* against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria,

and yeast; to assess the antioxidant activity of essential oils and plant extracts; and to determine the chemical composition of the essential oil and perform the phytochemical screening of the plant extracts.

## **MATERIAL AND METHOD**

### **Plant material**

The leaves of *P. cattleianum* were collected at the State University of Oeste do Paraná, Brazil (Latitude 24°57'1 S; Longitude 53°28'1 W) from January to April 2013. A sample of the plant material was sent, identified, and incorporated into the Herbarium of the State University of Oeste do Paraná (UNOP), under voucher number 1323, SCUR, M. C. 1.

The leaves collected were stored in an oven with air circulation at 40 °C until they were dried and ground in a cutting mill with particle size less than 0.42 mm. The dry extract was stored protected from light until its use for the production of extracts or essential oil extraction.

### **Obtaining aqueous extract (AQ)**

Twenty grams of the ground plant material mixed with 100 mL distilled water were put into a recipient. Subsequently, the solution was agitated in a rotary shaker at 220 rpm for 24 hours. Then, the material was filtered through filter paper (Whatman No. 1) and centrifuged at 5000 rpm for 15 min. The supernatant was collected and the extract was stored at 4 °C until use at a concentration of 200 mg/mL (Weber et al., 2014).

### **Obtaining ethanolic extract (ET)**

The ethanolic extract was obtained according to the method described by Ceyhan et al. (2012). About 10 g of the ground plant material mixed with 100 mL ethanol was put into a container. Subsequently, the solution was agitated in a rotary shaker at 220 rpm for 24 hours. After that procedure, it was filtered through filter paper (Whatman No. 1) and centrifuged at 5000 rpm for 15 min. The supernatant was collected and the extract was submitted to rotoevaporation in order to remove the solvent.

The extract obtained was diluted at a concentration of 150 mg/mL with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) following the proportion of its weight and volume. The extract obtained was stored at 4 °C until use.

### **Phytochemical screening of plant extracts**

The main secondary metabolites were detected using the method developed by Matos (1997) and Simões et al. (2005) assessing the presence of the following compounds classes: pyrogalic tannins; alkaloids; coumarins; saponins; anthocyanins; flavonoids; triterpenoids; and steroids.

### **Essential oil extraction**

About 70 g of the dry extract of the plant were added to 600 mL distilled water and submitted to steam distillation for three hours using a Clevenger-type-system. The oil was collected without the addition of any solvent and stored at 4 °C (Weber et al., 2014).

### **Analysis of the chemical composition of the essential oil**

The chemical composition of the essential oil of *P. catteianum* was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), the determination of its Kovats retention indexes (KI), and the comparison with the literature using the studies conducted by Yanez et al. (2002) and Biegelmeier et al. (2011).

### **GC-MS**

The chemical composition of the essential oil of *P. catteianum* was performed using a Thermo-Finigan GC-MS system, composed of a FOCUS GC gas chromatograph (Thermo Electron) coupled to a DSQ II mass spectrometer (Thermo Electron), and a TriPlus autosampler (Thermo Electron). Chromatographic separation was performed using a HP-5MS fused-silica capillary column (30 m long, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 µm stationary phase; composition of 5% phenyl and 95% dimethylpolysiloxane).

The injector temperature was 250 °C and samples and patterns of alkanes were injected into the split injector at a 1:25 ratio. The temperature programming was: 50 °C maintained for two minutes; temperature rise to 180 °C at a 2 °C min<sup>-1</sup> ratio; and followed by an increase to 290 °C at a 5 °C min<sup>-1</sup> ratio. The interface between the GC and the MS was maintained at 270 °C and the temperature of the ionization source for the mass spectrometer was 250 °C. The identification of the components of the essential oil was performed by comparing the retention times obtained in the analysis with the retention times of the literature reviewed by means of Kovats retention indices.

### **Microorganisms**

Microorganisms were used to determine the antimicrobial potential of the essential oil and plant extracts of *P. cattleianum*, they were: five gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Salmonella* Enteritidis ATCC 14028; *Proteus mirabilis* ATCC 25933; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; and *Escherichia coli* ATCC 25922; four gram-positive bacteria: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; and *Bacillus subtilis* CCCD-B005; and yeast *Candida albicans* ATCC 10231.

Microorganisms previously kept at -20 °C were recovered in an enriched brain heart infusion (BHI) medium and incubated at 36 °C for 24 hours. After this period, they were resuspended in 0.9% sterile saline solution to obtain the standard inoculum at a concentration of  $1 \times 10^8$  UFC/mL according to MacFarland scale. Subsequently, dilutions were performed in 0.9% sterile saline solution in order to obtain a final inoculum at a concentration of  $1 \times 10^5$  UFC/mL, with the exception of *C. albicans* which was used at a final concentration of  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

### **Determination of minimum inhibitory concentration**

#### **Essential oil**

The minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oil was determined using the broth microdilution method, according to CLSI document M31-A3 (2008) with modifications. Microtiter plates



with 96 wells were used to put 200 µl of essential oil of *P. cattleianum* at a concentration of 200 mg/mL diluted with methanol in Mueller-Hinton broth (MHB) for bacteria and RPMI medium for yeast in the first well and, after homogenization, successive dilutions were held obtaining final concentrations of 200 to 0.1 mg/mL. Aliquots of 10 µl of microorganisms were distributed in each well containing the essential oils in their final dilutions. The plates were incubated at 36 °C for 24 hours. Each well in which turbidity was observed received an aliquot of 10 µl of 0.5% triphenyl tetrazolium chloride (TTC), the plates were incubated again at 36 °C for three hours, and the MIC was defined as the lowest concentration of oil in mg/mL able to prevent microbial growth (Sartoratto et al., 2004).

### **Plant extracts**

The MIC of plant extracts was determined using the broth microdilution method proposed by Ayres et al. (2008) with modifications. Aliquots of 10 µl of microorganisms dilution were distributed in 96-well microtiter plates containing 150 µl of MHB (double concentration) for bacteria and RPMI for yeast with previous addition of extracts. The extracts were diluted in concentrations that ranged between 150 and 0.04 mg/mL. The plates were incubated at 36 °C for 24 hours and, subsequently, when the turbidity was observed, the same assessment standards used in the essential oil were performed.

### **Determination of the minimum bactericidal and fungicidal concentrations**

The minimum bactericidal concentration (MBC) for bacteria and the minimum fungicidal concentration (MFC) for fungi were determined using the method described by Santurio et al. (2007) with modifications. Before the addition of TTC for determining the MIC, 3 µL aliquots were removed from the wells and inoculated into the MH agar surface. The plates were incubated at 36 °C for 18 hours and, after this procedure, the MBC/MFC were defined as the lowest concentration of extracts able to cause death of the inoculum. The MIC, MBC and MFC tests were carried out in triplicate.

Distilled water and ethanol were used as negative control; gentamicin was used as positive control for bacteria; and nystatin was used for the yeast. Synthetic antimicrobials were tested at concentrations of

100 to 0.78 mg/mL. There was no microbial growth in the controls and the antimicrobials presented MIC and MBC/MFC less than 6.25 mg/mL.

### **Antioxidant activity**

The assessment of the antioxidant activity using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical method was evaluated as described by Scherer and Godoy (2009) with modifications. For the analysis, 0.1 mL of each dilution of the samples were put into test tubes containing 3.9 mL DPPH radical (0.2 mM) diluted with methanol and homogenized in a test tube agitator. For the negative control, 0.1 mL of control solution (methanol and water) was used with 3.9 mL DPPH radical and homogenized. Commercial synthetic antioxidant (butylated hydroxy toluene [BHT]) was used as standard and the same procedure of the negative control was performed. Methanol was used as blank, in order to calibrate the spectrophotometer (UV Mini 1240, Shimadzu Co.). After mixing, the absorbance of samples was measured using a spectrophotometer at 515 nm and monitored every 30 minutes, until the stabilization. The tests were carried out in triplicate.

The DPPH index was calculated using the equation:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$$

where  $Abs_0$  is the absorbance of the blank and  $Abs_1$  the absorbance of the sample. The experiments were conducted protected from light.

The concentrations of the samples (extracts and essential oil) responsible for a decrease of 50% in the initial activity of DPPH free radical ( $EC_{50}$ ) were calculated through linear regression of the antioxidant activity.

### **Statistical analysis**

The data obtained by calculating the DPPH and  $EC_{50}$  index were analyzed by Tukey's test with 5% significance using the Sisvar software (Ferreira, 2007).

## RESULTS AND DISCUSSION

The tests conducted for characterization and phytochemical screening of ethanolic and aqueous extracts of *P. cattleianum* (Table 1) revealed the presence of the same classes of metabolites, namely: tannins, saponins, flavonoids, and triterpenoids.

**Table 1.** Classes of secondary metabolites of ethanolic and aqueous extracts of *Psidium cattleianum*.

| Classes of metabolites | EXTRACTS |    |
|------------------------|----------|----|
|                        | ET       | AQ |
| Pyrogalic tannins      | +        | +  |
| Alkaloids              | -        | -  |
| Coumarins              | -        | -  |
| Saponins               | -        | -  |
| Anthocyanins           | -        | -  |
| Flavonoids             | +        | +  |
| Triterpenoids          | +        | +  |
| Steroids               | -        | -  |

\*- = absent; + = present; AQ = aqueous extract; ET = ethanolic extract.

Gonzalez et al. (2005), Paula et al. (2005), Fiuza et al. (2008), and Couto et al. (2009) conducted studies on members of the Myrtaceae family and observed the presence of the same classes of secondary metabolites in leaves of *Psidium guineense*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, *Eugenia uniflora*, and *Eugenia dysenterica*, respectively, corroborating the findings of the present study.

With respect to the biological potential attributed to the classes of metabolites found in the present study, it is known that the use of medicinal plants containing flavonoids is vast and, although some studies have shown that certain flavonoids may have mutagenic effect, in general, they are considered beneficial, being used for their antitumor, antiviral, antihemorrhagic, hormonal, antiinflammatory, antimicrobial, and antioxidant properties (Simões et al., 2005). Plants rich in tannins are used for their

antihemorrhagic, healing, and antiinflammatory properties and in the treatment of diarrhea, hypertension, rheumatism, gastritis, ulcers, and kidney disorders (Dufrense & Farnworth, 2001). Finally, the triterpenoids are known for their antihyperalgesic, antiinflammatory, and antimicrobial activities (Bagamboula et al., 2004).

With respect to the application of GC-MS, a total of 49 compounds were identified. The largest class of volatile compounds identified in the essential oil of *P. cattleianum* belongs to terpenic hydrocarbons, represented by  $\alpha$ -copaene, which constituted approximately 22% of the total area of the chromatogram peaks, followed by eucalyptol, (15%),  $\alpha$ -cadinene (10%), and  $\delta$ -selinene (6.42) (Table 2). The remaining compounds found showed peak areas of less than 4%.

**Table 2.** Chemical composition of the essential oil of *Prunus myrtifolia*

| RT    | Compound                    | Area (%) | KI     |
|-------|-----------------------------|----------|--------|
| 9.53  | $\alpha$ -pinene            | 3.32     | 931.1  |
| 10.28 | Camphene                    | 0.05     | 945.8  |
| 11.71 | $\beta$ -pinene             | 0.21     | 973.8  |
| 12.49 | $\beta$ -minene             | 1.68     | 997.9  |
| 13.34 | $\alpha$ -phellandrene      | 0.04     | 1004.9 |
| 13.95 | $\alpha$ -terpinene         | 0.07     | 1015.2 |
| 14.44 | P-cimene                    | 0.80     | 1023.4 |
| 14.77 | D-limonene                  | 1.50     | 1029.0 |
| 15.04 | Eucalyptol                  | 15.05    | 1033.6 |
| 15.23 | $\beta$ -ocimene            | 0.46     | 1036.8 |
| 16.49 | $\gamma$ -terpinene         | 0.12     | 1058.0 |
| 18.18 | $\alpha$ -perpinolene       | 0.04     | 1086.5 |
| 19.30 | $\beta$ -linallol           | 0.46     | 1104.6 |
| 23.83 | Borneol                     | 0.05     | 1169.1 |
| 24.46 | 4-terpineol                 | 0.34     | 1178.1 |
| 25.54 | $\alpha$ -terpineol         | 1.41     | 1193.5 |
| 35.47 | $\alpha$ -terpineol acetate | 1.25     | 1344.5 |
| 37.36 | $\alpha$ -copaene           | 21.96    | 1373.3 |
| 39.82 | Caryophyllene               | 2.36     | 1411.3 |
| 40.42 | $\beta$ -gurjunene          | 0.32     | 1421.5 |
| 42.00 | $\beta$ -Caryophyllene      | 1.19     | 1447.2 |
| 42.25 | Alloaromadendrene           | 0.97     | 1455.3 |
| 43.34 | $\gamma$ -muurolene         | 2.05     | 1469.0 |
| 43.87 | $\alpha$ -curcumene         | 0.24     | 1477.7 |
| 44.15 | $\beta$ -selinene           | 7.73     | 1482.2 |

|       |                           |      |        |
|-------|---------------------------|------|--------|
| 44.60 | $\alpha$ -selinene        | 6.42 | 1489.6 |
| 44.77 | $\gamma$ -muuorelene      | 1.43 | 1492.3 |
| 45.06 | Cis- $\alpha$ -bisabolene | 0.15 | 1497.1 |
| 45.49 | $\beta$ -bisabolene       | 0.82 | 1504.3 |
| 45.60 | $\gamma$ -cadinene        | 0.60 | 1506.1 |
| 46.06 | $\delta$ -cadinene        | 9.63 | 1514.0 |
| 47.16 | $\alpha$ -calacorene      | 0.52 | 1532.8 |
| 48.67 | $\pm$ -Trans-nerolidol    | 0.68 | 1558.5 |
| 49.19 | (-)-Spathulenol           | 0.10 | 1567.4 |
| 49.45 | Caryophyllene oxide       | 1.22 | 1571.8 |
| 50.19 | Globulol                  | 0.99 | 1584.5 |
| 50.73 | Ledol                     | 0.19 | 1593.7 |
| 51.04 | Cubenol                   | 0.65 | 1599.0 |
| 51.53 | Eudesm-7(11)-en-4-ol      | 0.67 | 1607.8 |
| 52.16 | Cubenol                   | 1.60 | 1619.2 |
| 52.96 | $\tau$ -cadinol           | 0.86 | 1633.6 |
| 53.28 | $\delta$ -cadinol         | 1.29 | 1639.4 |
| 55.49 | $\alpha$ -bisabolol       | 0.52 | 1679.4 |

\* KI – Kovats index calculated; \*\* KI – Kovats index in the literature, \*RT - Retention time.

The compound  $\alpha$ -copaene is a non-oxygenated sesquiterpenic hydrocarbon known for being one of the majority constituents of copaiba oil, used due to its antimicrobial, antiinflammatory, and healing action (Brito et al., 2005).

Eucalyptol is a monoterpene of low toxicity to humans used in the industry, medicine, and for a long time in aromatherapy (Tripathi et al., 2001). In addition to the use for its aroma, eucalyptol has other properties such as antimicrobial (Williams et al., 1998), antioxidant (Lee & Shibamoto, 2001), bioinsecticidal (Sukontason et al., 2004), antiinflammatory, and antimucolitic action (Beuscher et al., 2000).

Regarding  $\alpha$ -cadinene and  $\delta$ -selinene, although they are present in essential oils of some plant species, there are no reports in the literature about the biological potential of these compounds.

Li, Chen, and Luo (1999) conducted a study on *Psidium guajava* plant through GC-MS and they observed the presence of majority compounds, such as caryophyllene (18.81%); copaene (11.80%); and eucalyptol (7.36%), corroborating with the present study by the presence of the compounds, although with different amounts.

Marques et al. (2008) conducted a phytochemical characterization of the essential oil of *P. cattleianum* collected in the Atlantic Forest of southern Brazil. They used the GC-MS method and the majority constituent found was eucalyptol (16.4%), among others, corroborating with the finding of the present study. Pino et al. (2004) analyzed the phytochemical composition of *P. cattleianum* collected in Cuba and they identified 18 compounds. The majority compounds were epi- $\alpha$ -muurolol (21.9%),  $\alpha$ -cadinol (20%), epi- $\alpha$ -cadinol (16.7%), and caryophyllene (13.6%), agreeing with the present study only by the presence of the compounds, since they were not the majority.

When scientific articles are compared, the differences between the phytochemical constituents and their concentrations can result from several factors, such as intraspecific genetic variability, environmental aspects, collection times, growing conditions, soil type, and part of the plant analyzed, which can influence both the content of compounds present in the essential oil and its chemical composition (Alves et al., 2008).

The results presented in Table 3 show that the plant extracts and the essential oil of *P. cattleianum* tested exhibited antimicrobial activity against the microorganisms assessed.

**Table 3.** Antimicrobial activity of plant extracts and essential oil of *Psidium cattleianum* against microorganisms of importance to public health represented by the values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC).

| Microorganisms |                       | MIC/MBC or MFC (mg/mL) |           |         |
|----------------|-----------------------|------------------------|-----------|---------|
|                |                       | ET                     | AQ        | EO      |
| Gram -         | <i>P. aeruginosa</i>  | 25/25                  | 25/25     | 200/200 |
|                | <i>S. Enteritidis</i> | 25/25                  | 50/50     | 200/200 |
|                | <i>P. mirabilis</i>   | 6.25/6.25              | 6.25/6.25 | 200/200 |
|                | <i>K. pneumonia</i>   | 0.78/1.56              | 6.25/12.5 | 200/200 |
|                | <i>E.coli</i>         | 6.25/25                | 12.5/50   | 200/200 |
| Gram +         | <i>E. faecalis</i>    | 6.25/25                | 12.5/12.5 | 200/200 |
|                | <i>S. epidermidis</i> | 0.78/1.56              | 12.5/12.5 | 200/200 |
|                | <i>S. aureus</i>      | 3.125/3.125            | 12.5/12.5 | 200/200 |
|                | <i>B. subtilis</i>    | 6.25/6.25              | 6.25/6.25 | 200/200 |
| Yeast          | <i>C. albicans</i>    | 3.125/3.125            | 6.25/6.25 | 200/200 |

\* EO = essential oil; AQ = aqueous extract; ET = ethanolic extract.

With respect to plant extracts, the ethanolic extract showed the highest antimicrobial activity against microorganisms tested when compared to the aqueous extract regarding the MIC and the MBC, except for the two extracts of *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, and *B. subtilis* which presented the same MIC and MBC values.

In the ethanolic extract, the MIC ranged from 0.78 to 25 mg/mL for gram-negative bacteria, 0.78 to 3.125 mg/mL for gram-positive bacteria, and exhibited a MIC of 3.125 mg/mL for yeast *C. albicans*. The MBC ranged from 1.56 to 25 mg/mL for gram-negative and gram-positive bacteria, and exhibited a value of 3.125 mg/mL for yeast *C. albicans*.

With respect to the aqueous extract, the MIC and the MBC ranged from 6.25 to 50 mg/mL for gram-negative bacteria, 6.25 to 12.5 mg/mL for gram-positive bacteria, and presented MIC and MBC of 6.25 mg/mL for yeast *C. albicans*.

Regarding the antimicrobial activity of the essential oil of *P. cattleianum*, the MIC and the MBC had a value of 200 mg/mL for all microorganisms tested.

According to Aligianis et al. (2001), the antimicrobial activity can be classified as follows: MIC of <0.5 mg/mL, corresponding to a strong antimicrobial inhibition; MIC from 0.6 to 1.5 mg/mL, which represents a moderate inhibition; and MIC of >1.6 mg/mL corresponding to a weak inhibition. Taking this classification into consideration, the ethanolic extract showed moderate activity against *K. pneumoniae* and *S. epidermidis*, whereas it exhibited weak activity for the other microorganisms. The aqueous extract and the essential oil presented weak activity, even though they had inhibited the growth of microorganisms.

The antimicrobial effect presented by the plant extracts may be associated with the presence of secondary metabolites found in this study, such as tannins, flavonoids, and triterpenoids (Table 1), since there are reports in the literature about the antimicrobial potential of these classes of secondary metabolites (Recio et al., 1989).

Sanches et al. (2005) observed that the aqueous and the hydroethanolic extracts of *P. guajava* exhibited antimicrobial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *E. faecalis*. The authors associated the activity of the extracts with the presence of flavonoids, also corroborating with the data found in the present study.

Regarding the action of the compounds found in the extracts in bacterial cells, it is known that the flavonoids act in bacterial cells through the formation of complexes between proteins and the cell wall, causing its rupture (Taguri et al., 2004). On the other hand, tannins act in the microorganisms by preventing their growth through the inhibition of the transport of nutrients and the formation of complexes between the tannins and the bacterial cell wall (McSweeney et al., 2001). Finally, the action mechanism of triterpenoids in microorganisms is associated with the disruption of lipophilic compounds of microbial membranes, causing their death (Bagamboula et al., 2004).

The antimicrobial activity found in the essential oil of *P. cattleianum* can be attributed to the presence of some compounds such as  $\alpha$ -copaene, eucalyptol,  $\delta$ -cadinene, and  $\alpha$ -selinene, which were the majority compounds, respectively. In addition, the activity may result from the synergistic action between all the compounds present in the essential oil (Lopes et al., 2013).

Although the specific action of  $\alpha$ -copaene,  $\alpha$ -cadinene, and  $\delta$ -selinene in bacterial cells are not reported, it is known that the sesquiterpenes are produced by plants to exert antimicrobial activity (Buchanan et al., 2000) by means of interference in the transduction process (Calixto, 2000).

Mojica et al. (2011) assessed the correlation between the antibacterial activity and the components of the essential oil of *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae) and observed that the components that significantly influenced the antibacterial activity against *S. aureus*, *B. subtilis*, and *E. faecalis* were  $\alpha$ -copaene and  $\alpha$ -terpineol, both present in *P. cattleianum*. The antibacterial activity found in the present study can be attributed to these compounds, although the activity of essential oils is not always due to a



single constituent, since the synergistic effect between the components may be responsible for the antimicrobial potential (Varel, 2002).

With respect to the mode of action of eucalyptol, there are no reports in the literature of its specific action in bacterial cells. However, Trombeta et al. (2005) and Turina et al. (2006) reported that due to the high hydrophobicity of monoterpenes, their toxic effects on the bacterial cell membrane result in its expansion, fluidity, and permeability, in addition to causing inhibition of respiration and change in the process of ions transport.

Even though eucalyptol has antimicrobial activity reported, a study assessed the antimicrobial potential of various species of the genus eucalyptus and no antimicrobial activity was attributed to this compound but to the synergistic capabilities between all the compounds of the essential oil (Cimanga et al., 2002).

The DPPH scavenging index and the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value were determined to assess the antioxidant activity of plant extracts and the essential oil of *P. cattleianum* (Table 4). The commercial synthetic antioxidant BHT was used as an equivalence parameter for the antioxidant activity of plant extracts and the essential oil.

**Table 4.** DPPH index (% scavenging) and IC<sub>50</sub> value of the essential oil and plant extracts of *Psidium cattleianum* at different concentrations tested.

| Extracts/Oils | Scavenging percentage | IC <sub>50</sub> |
|---------------|-----------------------|------------------|
| BHT           | 95.84 ± 0.07 a        | 11.51 ± 0.11 a   |
| ET 200 mg/MI  | 94.57 ± 0.43 ab       | 13.90 ± 0.53 a   |
| ET 150 mg/mL  | 94.29 ± 0.36 abc      | 14.92 ± 0.42 a   |
| ET 100 mg/mL  | 94.00 ± 0.39 bc       | 14.96 ± 0.53 a   |
| AQ 200 mg/mL  | 92.62 ± 0.12 cd       | 17.57 ± 0.20 a   |
| AQ 150 mg/mL  | 92.00 ± 0.20 d        | 18.72 ± 0.37 a   |
| AQ 100 mg/mL  | 91.58 ± 0.16 d        | 19.51 ± 0.22 a   |
| EO 100 mg/mL  | 16.19 ± 2.33 e        | 171.14 ± 2.56 b  |
| EO 75mg/mL    | 8.50 ± 1.23 f         | 172.05 ± 1.48 b  |
| EO 50 mg/mL   | 4.01 ± 0.80 g         | 183.99 ± 0.84 b  |
| Control       | 0 ± 0 h               | 191.54 ± 0 b     |

\*Standard error of the mean followed by the same letter in the columns does not differ statistically according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ); ET = ethanolic extract; AQ = aqueous extract; EO = essential oil.

With respect to the results of the free radicals scavenging percentage of plant extracts and essential oil of *P. cattleianum* (Table 1), the ethanolic extract exhibited the greatest antioxidant activity, with a scavenging percentage ranging from 94.57 to 94%, followed by the aqueous extract, varying between the 92.62 and 91.58%, and the essential oil, which presented lower antioxidant activity, varying from 16.19 to 4.01%.

Regarding the  $IC_{50}$  values calculated, it should be noted that they were inversely related to the percentage of DPPH scavenging, since the higher the percentage of free radicals scavenging of the sample tested, the lower the  $IC_{50}$ . However, the statistical relationship between the data was not the same and the aqueous and ethanolic extracts at the three concentrations tested did not show significant differences compared to the synthetic antioxidant BHT, as presented in the scavenging percentage. On the other hand, the essential oil showed no statistical difference compared with the control group showing low activity. Although the relationship between the data had not remained the same, the results are evident, since the extracts presented effective antioxidant activity comparable to the synthetic product.

The antioxidant activity found in the plant extracts may result from the presence of compounds found in the phytochemical screening, since flavonoids, triterpenes, and tannins are polar compounds and excellent antioxidants, because they are electron donors (Table 1) (Gao, 1999).

A study conducted by Ilha et al. (2008) showed that the ethanolic extract of *P. guajava* had exhibited antioxidant activity, which, according to the authors, was due to the presence of flavonoids, a group of compounds also present in the extracts of the present study. Still, according to the authors, the antioxidant activity of *P. cattleianum* was reported for its fruits, due to the presence of phenolic compounds, especially flavonoids (Medina et al., 2011).

Analyzing the remaining genera of the Myrtaceae family, other potential antioxidants stand out, such as species of the genera *Eugenia* (Magina et al., 2010), *Syzygium* (Donatini et al., 2009), and *Plinia* (Souza-Moreira et al., 2010).

The low antioxidant activity found for the essential oil can be explained as a result from the absence of compounds such as flavonoids, which are one of the main responsible elements for the antioxidant activity of natural products (Podsdek, 2007).

Considering the results obtained throughout the study, it can be mentioned that although the species *P. cattleianum* has not been widely studied, it has potential for being used as antimicrobial and antioxidant. In addition, it has compounds of industrial interest. This way, the importance of phytochemical studies is highlighted, since they may reveal biological activities of plant extracts and essential oils. Also, it is worth mentioning the importance of initial studies in order to determine the biological activities present in chemical compounds, so that they may be useful as the basis for further studies, such as the isolation of compounds possibly responsible for biological activities. With regard to antioxidant activity, the importance of its determination is relevant, since the compounds used in the formulation of the most various products should present combined actions, such as antimicrobial and antioxidant.

## **CONCLUSION**

With respect to the antimicrobial activity, the microorganisms proved susceptible to the essential oil and aqueous and ethanolic plant extracts, demonstrating the antimicrobial potential of *P. cattleianum*.

Regarding the antioxidant activity, the essential oil showed no activity, whereas the ethanolic and aqueous extracts exhibited significant values comparable to values of synthetic antioxidants.

The majority compounds of the chemical composition of the essential oil were  $\alpha$ -copaene, eucalyptol,  $\delta$ -cadinene, and  $\alpha$ -selinene, respectively, and the phytochemical tests performed with aqueous

and ethanolic plant extracts of *P. cattleianum* revealed the presence of flavonoids, terpenoids, and tannins, and the chemical composition of the essential oil presented  $\alpha$ -copaene, eucalyptol,  $\delta$ -cadinene, and  $\alpha$ -selinene as the majority compounds, respectively.

## REFERENCES

AGRA, MF., SILVA, KN., BASÍLIO, IJD., FRANÇA, PF. and BARBOSA-FILHO, JM., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.18, p.472-508.

ALIGIANIS, N., KALPOUTZAKIS, E., MITAKU, S. and CHINO, B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.4168-70.

ALVES, EG., VINHOLIS, AHC., CASEMIRO, LA., FURTADO, NAJC., SILVA, MLA., CUNHA, WR. and MARTINS, CHG., 2008. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, v.31, p.1224-1229.

ARYA, V., YADAV, S., KUMAR, S. and YADAV, JP., 2010. Antimicrobial Activity of *Cassia occidentalis* L (Leaf) against various Human Pathogenic Microbes. *International Journal of Life Science and Medical Research*, vol.9, p.1-11.

AYRES, MCC., BRANDÃO, MS., VIEIRA-JUNIOR, GM., MENOR, JCS., SILVA, HB., SOARES, MJ. and CHAVES, MH., 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz

de *Copernicia prunifera*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.1, p.90-97.

BAGAMBOULA, CF., UYTENDAELE, M. and DEBEVERE, J., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). Food Chemistry, vol.84, p.519-525.

BEUSCHER, N. and ELSTNER, EF., 2000. Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. Arzneimittelforschung, v.50, p.135-139.

BRITO, MVH., MOREIRA, RJ., TAVARES, MLC., CARBALLO, MCS., CARNEIRO, TX. and SANTOS, AAS., 2005. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. Acta Cirúrgica Brasileira, v.20, p.243-246.

BUCHANAN, B., GRUISSEM, W. and JONES, R., 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, v.10, p.1250-1318.

CALIXTO, JB., BEIRITH, A., FERREIRA, J., SANTOS, ARS., CECHINEL-FILHO, V. and YUNES, RA., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. Phytotherapy Research, v.14, p.401-418.

CEYHAN, N., KESKIN, D. and ZORLU, Z., 2012. Chemical constituents and antimicrobial activity of the leaves of Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.), An Endemic Plant from West Anatolia. Journal of Pure and Applied Microbiology, v.6, p.1147-1453.

CIMANGA, K., KAMBU, K., TONA, L., APERS, S., BRUYNE, T., HERMANS, N., TOTTE, J., PIETERS, L. and VLIETINCK, AJ., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, v.79, p.213-220.

COUTO, RO., VARGAS, AB., BARA, MTF. and PAULA, JR., 2009. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.3, p.59-69.

DONATINI, RS., ISHIKAWA, T., BARROS, SBM., BACCHI, EM., 2009. Atividade antiulcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.89-94.

DUFRENSE, CJ. and FARNWORTH, ER., 2001. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.12, p.404-421.

Ferreira DF (2007). Sistema Sisvar para análises estatísticas. <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>> Acesso em Fev 2014.

FIUZA, TS., REZENDE, MH., SABÓIA-MORAIS, SMT., BARA, MTF. and TRESVENZOL, LMF., 2008. Caracterização Farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.5, p.521-31.

GAO, Z., HUANG, K., YANG, X., XU, H., 1999. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from radiz of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1472, p.643-650.

GONZALEZ, AMN., GONZALEZ, MBR. and PINTO, NLS., 2005. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v.10, p.1-5.

IHA, SM., MIGLIATO, KF., VELLOSA, JCR., SACRAMENTO, LVS., PIETRO, RCLR., ISSAC, VLB., BRUNETTI, IL., CORRÊA, MA. and SALGADO, HRN., 2008. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.387-393.

LANDRUM, LR., 2003. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrteacea). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, v.20, p.1449-1469.

LEE, KG. and SHIBAMOTO, T., 2001. Antioxidant activities of volatile componentes isolated from *Eucalyptus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.81, p.1573-1579.

LI, J., CHEN, F. and LUO, J., 1999. GC-MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*. *Zhong Yao Cai*, v.22, p.78-80.

LOPES, LTA., PAULA, JR., TRESVENZOL, LMF., BARA, MTF., SÁ, S., FERRI, PH. and FIUSA, TF., 2013. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar

de *Citrus limettioides* Tanaka (Rutaceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.34, p.503-511.

LUCAS, EJ., BELSHAM, SR., LUGHADHA, NEM., OLOVICH, DA., SAKURAGUI, CM., CHASE, MW. and WILSON, PG., 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae: preliminary molecular evidence. Plant Systematics and Evolution, v.251, p.35-45.

MAGINA, AG., MORESCO, HH., COLLA, G., PIZZOLATTI, MG. and BRIGHENTE, IMC., 2010. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p.387-393.

MARQUES, FA., WENDLER, EP. and MAIA, BHLN., 2008. Volatile Oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Fores. Journal of Essential Oil Research, v.20, p.519-520.

MATOS, FJ., 1997. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições.

MCSWEENEY, CS., PALMER, B., BUNCH, R. and KRAUSE, DO., 2001. Effect of the tropical forage *Calliandra* on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. Journal of Applied Microbiology, v.90, p.78-88.

MEDINA, AL., HASS, LIR., CHAVES, FC., SALVADOR, M., ZAMBIAZI, RC., SILVA. WP., NORA, L. and ROMBALDI, CV., 2011. Aracá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. Food Chemistry, v.128, p.916-922.



MOJICA, SRD., CAJIAO, PAM., YANEZ, RX., 2011. Correlacion entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, v.9, p.9-14.

PAULA, JAM., BARA, MTF., REZENDE, MH., FERREIRA, HD. and PAULA, JR., 2005. Estudo Farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (GOMES) L. R. Landrum – *Myrtaceae*. Revista Eletrônica de Farmácia, v.2, p.153-156.

PINO, JA., BELLO, A., URQUIOLA, A., MARBOT, R. and MARTÍ, MP., 2004. Leaf oils of *Psidium parvifolium* Griseb and *Psidium cattleianum* Sabine from Cuba. Journal of Essential Oil Research, v.15, p.187-188.

PINTO, AC., SILVA, DHS., BOLZANI, VS., LOPES, NP. and EPIFANIO, RA., 2002. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, v.25, p.45-61.

PODSEDEK, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. Swiss Soc. Journal of Food Science and Technology, v.40, p.1-11.

RECIO, MC., RIOS, JL. and VILLAR, A., 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. Phytotherapy Research, v.3, p.117-125.

SACCHETTI, G., MAIETTI, S., MUZZOLI, M., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S., RADICE, M. and BRUNI, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v.91, p.621-632.

SANCHES, NR., CORTEZ, DAG., SCHIAVINI, MS. and FILHO, BPD., 2005. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, p.429-436.

SANTOS, MS., PETKOWICZ, CLO., WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A. and CARNEIRO, EBB., 2007. Caracterização do suco de aracá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.29, p.617-621.

SANTURIO, MJ., SANTURIO, DF., POZZATTI, P., MORAES, C., FRANCHIN, PR. and ALVES, SH., 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente à sorovares de *Salmonella* de origem avícola. *Ciência Rural*, v.37, p.803-808.

SARTORATTO, A., MACHADO, ALM., DELARMELENA, C., FIGUEIRA, GL., DUARTE, MCT. and REHDER, VLC., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.275-280.

SCHERER, R. and GODOY, HT., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-494 picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v.112, n.3, p.654-658.

SILVA, A., PEREZ, SCJGA. and PAULA, RC., 2011. Qualidade fisiológica de sementes de *Psidium cattelianum* Sabine acondicionadas e armazenadas em diferentes condições. Revista Brasileira de Sementes, v.33, p.197-206.

SIMÕES, CMO., SCHENKEL, EP., GOSMANN, G., MELLO, JCP., MENTZ, LA. and PETROVICK, PR., 2005. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 1104p. Porto Alegre: RS. Editora da UFSC, no. 5.

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F. and LUCAS, E., 2010. Myrtaceae In: Lista de espécies da flora do brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB010262>>. Acesso em Jun 2014.

SOUSA, FCF., MELO, CTV., CITÓ, COM., FÉLIX, FHC., VASCONCELOS, SMM., FONTELES, MMF., BARBOSA-FILHO, JM. and VIANA, GSB., 2008. Medicinal plants and their bioactive constituents: A scientific review of bioactivity and potential benefits in the anxiety disorders in animal models. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p.642-654.

SOUZA-MOREIRA, TM., MOREIRA, RRD., SCRAMENTO, LVS., PIETRO, RCLR., 2010. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, *Myrtaceae*, leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.20, p.48-53.

SUKONTASON, KL., BOONCHU, N., SUKONTASON, K., CHOOCHOTE, W., 2004. Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: *Calliphoridae*). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.46, p.97-101.

TAGURI, T., TANAKA, T. and KUONO, I., 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.27, p.1965-1969.

TRIPATHI, AK., PRAJAPATI, V., AGGARWAL, KK. and KUMAR, S., 2001. Toxicity, feeding deterrence and effect of activity of 1,8-Cineole from *Artemisia annua* on propeny production of *Tribolium castanerum* (Coleoptera: *Tenebrionidae*). *Journal of Economic Entomology*, v.94, p.979-983.

TROMBETA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, MG., VENUTI, V., CRISTANI, M., DANIELE, C., SAIJA, A., MAZZANTI, G. and BISIGNANO, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, p.2474-2478.

TUCKER, AO., MACIARELLO, MJ. and LANDRUM, LR., 1995. Volatile leaf oils of American Myrtaceae III. *Psidium cattleianum* Sabine, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu, *P. guajava* L., *Psidium guineense* Sw., and *Psidium sartorianum* (Berg) Niedenzu. *Journal of Essential Oil Research*, v.7, p.187-190.

TURINA, A., DEL, V., NOLAN, MV., ZYGADLO, JA. and PERILLO, MA., 2006. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, v.122, p.101-113.

VAREL, VH., 2002. Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. *Current Microbiology*, v.44, p.38-43.

WEBER, LD., PINTO, FGS., SCUR, MC., SOUZA, JGL., COSTA, WF. and LEITE, CW., 2014. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia*. African Journal of Agricultural Research, v.9, p.846-853.

WILLIAMS, LR., STOGKLEY, JK., YAN, W. and HOME, VN., 1998. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. International Journal of Aromatherapy, v.8, p.30-40.

## NORMAS DA REVISTA

### Finalidade e normas gerais

O **Brazilian Journal of Biology** publica resultados de pesquisa original em qualquer ramo das ciências biológicas. Estará sendo estimulada a publicação de trabalhos nas áreas de biologia celular, sistemática, ecologia (auto-ecologia e sinecologia) e biologia evolutiva, e que abordem problemas da região neotropical.

A revista publica somente artigos em inglês. Artigos de revisões de temas gerais também serão publicados desde que previamente propostos e aprovados pela [Comissão Editorial](#).

**Informações Gerais:** Os originais deverão ser enviados à [Comissão Editorial](#) e estar de acordo com as Instruções aos Autores, trabalhos que não se enquadrem nesses moldes serão imediatamente devolvidos ao(s) autor(es) para reformulação.

Os trabalhos que estejam de acordo com as Instruções aos Autores, serão enviados aos assessores científicos, indicados pela [Comissão Editorial](#). Em cada caso, o parecer será transmitido anonimamente aos autores. Em caso de recomendação desfavorável por parte de um assessor, será usualmente pedida a opinião de um outro. Os trabalhos serão publicados na ordem de aceitação pela [Comissão Editorial](#), e não de seu recebimento. Serão fornecidas gratuitamente 25 separatas de cada artigo.

### Preparação de originais

O trabalho a ser considerado para publicação deve obedecer às seguintes recomendações gerais:

Ser digitado e impresso em um só lado do papel tipo A4 e em espaço duplo com uma margem de 3 cm à esquerda e 2 cm à direita, sem preocupação de que as linhas terminem alinhadas e sem dividir palavras no final da linha. Palavras a serem impressas em itálico podem ser sublinhadas.

O título deve dar uma idéia precisa do conteúdo e ser o mais curto possível. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de página.

*Nomes dos autores* – As indicações Júnior, Filho, Neto, Sobrinho etc. devem ser sempre antecidas por um hífen. Exemplo: J. Pereira-Neto. Usar também hífen para nomes compostos (exemplos: C. Azevedo-Ramos, M. L. López-Rulf). Os nomes dos autores devem constar sempre na sua ordem correta, sem inversões. Não usar nunca, como autor ou co-autor nomes como Pereira-Neto J. Usar *e*, *y*, *and*, *et* em vez de & para ligar o último co-autor aos antecedentes.

Os trabalhos devem ser redigidos de forma concisa, com a exatidão e a clareza necessárias para sua fiel compreensão. Sua redação deve ser definitiva a fim de evitar modificações nas provas de impressão, muito onerosas e cujo pagamento ficará sempre a cargo do autor. Os trabalhos (incluindo ilustração e tabelas) devem ser submetidos em triplicata (original e duas cópias).

Serão considerados para publicação apenas os artigos redigidos em inglês. Todos os trabalhos deverão ter resumos em inglês e português. Esses resumos deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente. O Abstract e o Resumo devem conter as mesmas informações e sempre sumariar resultados e conclusões.

Em linhas gerais, as diferentes partes dos artigos devem ter a seguinte seriação:

1º página – Título do trabalho. Nome(s) do(s) autor(es). Instituição ou instituições, com endereço. Indicação do número de figuras existentes no trabalho. Palavras-chave em português e inglês (no máximo 5). Título abreviado para cabeça das páginas. Rodapé: nome do autor correspondente e endereço atual (se for o caso).

2º página e seguintes – Abstract (sem título). Resumo: em português (com título); Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Agradecimentos.

Em separado - Referências, Legendas das figuras, Tabelas e Figuras.

As seguintes informações devem acompanhar todas as espécies citadas no artigo:

- Para zoologia, o nome do autor e da data de publicação da descrição original deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos;
- Para botânica e ecologia, somente o nome do autor que fez a descrição deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos.

O trabalho deverá ter, *no máximo*, 25 páginas, incluindo tabelas e figuras, em caso de Notes and Comments limitar-se a 4 páginas.

A seriação dos itens de Introdução e Agradecimentos só se aplicam, obviamente, a trabalhos capazes de adotá-la. Os demais artigos (como os de Sistemática) devem ser redigidos de acordo com critérios geralmente aceitos na área.

### **Referências Bibliográficas:**

1. Citação no texto: Use o nome e ano: Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar e Rocha, 2000). Há mais de dois autores usar *et al.*
2. Citações na lista de referências, em conformidade com a norma **ISO 690/1987**.

LOMINADZE, DG., 1981. Cyclotron waves in plasma. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. 206 p. International series in natural philosophy, no. 3.

WRIGLEY, EA., 1968. Parish registers and the historian. In STEEL, DJ. National index of parish registers. London: Society of Genealogists. p. 15-167.

CYRINO, JEP. and MULVANEY, DR., 1999. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells - BB line. Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology, vol. 59, no. 3, p. 517-525.

LIMA, PRS., 2004. Dinâmica populacional da Serra Scomberomorus brasiliensis (Osteichthyes; Scombridae), no litoral ocidental do Maranhã-Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 45 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

WU, RSS., SHANG, EWV. and ZHOU, BS., 2006. Endocrine disrupting and teratogenic effects of hypoxia on fish, and their ecological implications. In Proceedings of the Eighth International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality, 2005. Georgia, USA: EPA. p. 75-86.

Para outros pormenores, veja as referências bibliográficas em um fascículo.

A Revista publicará um Índice inteiramente em inglês, para uso das revistas internacionais de referência.

As provas serão enviadas aos autores para uma revisão final (restrita a erros e composição) e deverão ser devolvidas imediatamente. As provas que não forem devolvidas no tempo solicitado - 5 dias - terão sua publicação postergada para uma próxima oportunidade, dependendo de espaço.

*Material Ilustrativo* – Os autores deverão limitar as tabelas e as figuras (ambas numeradas em arábicos) ao **estritamente necessário**. No texto do manuscrito, o autor indicará os locais onde elas deverão ser intercaladas.

As tabelas deverão ter seu próprio título e, em rodapé, as demais informações explicativas. Símbolos e abreviaturas devem ser definidos no texto principal e/ou

legendas.

Na preparação do material ilustrativo e das tabelas, deve-se ter em mente o tamanho da página útil da REVISTA (22 cm x 15,0 cm); (coluna: 7 cm) e a idéia de conservar o sentido vertical. Desenhos e fotografias exageradamente grandes poderão perder muito em nitidez quando forem reduzidos às dimensões da página útil. As pranchas deverão ter no máximo 30 cm de altura por 25 cm de largura e incluir barra(s) de calibração.

As ilustrações devem ser agrupadas, sempre que possível. A Comissão Editorial reserva-se o direito de dispor esse material do modo mais econômico, sem prejudicar sua apresentação.

### **Comprovante de envio do artigo à revista**

Prezado(a) Autor(a) **Mayara Scur**

Acusamos o recebimento do artigo “Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine” na editoria do Brazilian Journal of Biology, o mesmo será encaminhado à Comissão Editorial para 1ª triagem.

Att.

Rogério Pessa – assessor editorial

***Brazilian Journal of Biology***



## **Capítulo 2: Avaliação *in vitro* de desinfetantes frente a sorotipos de *Salmonella* isolados de granjas avícolas**

### **Avaliação *in vitro* de desinfetantes frente a sorotipos de *Salmonella* isolados de granjas avícolas**

#### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a eficácia de desinfetantes comumente utilizados na sanitização de aviários e desinfetantes biodegradáveis frente a sorotipos de *Salmonella* isolados de aviários no estado do Paraná, Brasil. Foram testados cinco sorotipos de *Salmonella* de maior incidência nos aviários nos últimos cinco anos sobre os desinfetantes comumente utilizados: glutaraldeído, quaternário de amônia, hipoclorito de sódio e iodo, além dos desinfetantes biodegradáveis, ácidos orgânicos e ácido peracético. Os experimentos foram realizados utilizando o tempo de contato de 20 minutos e testados os produtos em três concentrações, CR (concentração recomendada pelo fabricante),  $\frac{1}{2}$ CR (metade da concentração recomendada) e 2CR (dobro da mesma), bem como na presença e ausência de matéria orgânica. Em geral, todos os desinfetantes causaram redução significativa nas contagens dos micro-organismos em relação ao controle. Na ausência de matéria orgânica, os desinfetantes a base de ácidos orgânicos apresentaram os melhores resultados frente aos sorotipos Enteritidis, Pullorum e Gallinarum e os desinfetantes a base de glutaraldeído e hipoclorito de sódio frente aos sorotipos Typhimurium e Intantis. Na presença de matéria orgânica, pode-se observar que todos os desinfetantes apresentaram sua eficácia diminuída, sendo que o desinfetante a base de ácidos orgânicos apresentou as menores contagens de UFC. Nesse sentido, o desinfetante a base de ácidos orgânicos mostraram-se uma

potencial alternativa de uso na avicultura, pela eficácia no controle dos sorotipos de *Salmonella* de granjas avícolas.

**PALAVRAS-CHAVE:** avicultura, *Samonella* spp, desinfetantes, ácidos orgânicos.

## **INTRODUÇÃO**

O agronegócio representa todas as atividades de comércio, envolvendo a produção agrícola. O Brasil está inserido no setor de agronegócio, e um dos setores que contribuem diretamente com esse mercado, é a avicultura. Mundialmente é o terceiro maior produtor de carne, e o estado do Paraná destaca-se pela produção de 30% do abate total de frangos do país (União Brasileira de Avicultura, 2013).

O desenvolvimento da produção de frangos no país, favoreceu a disseminação de doenças transmitidas por alimentos de origem avícola, tornando os programas de desinfecção dos aviários um dos principais processos na prevenção e controle de patógenos ao longo da cadeia produtiva (Borowsky et al., 2006).

No sistema de produção intensivo, os desinfetantes amplamente utilizados são à base de glutaraldeído, iodo, hipoclorito de sódio e amônia quaternária, no entanto estes são potencialmente prejudiciais ao meio ambiente. Já na produção orgânica de aves, os produtos adotados devem ter princípios ativos biodegradáveis reduzindo a a pressão ambiental, destacando-se nesse sentido os ácidos orgânicos e peracético (Jaenisch et al., 2010).

Outro fator que deve ser levado em consideração é a resistência microbiana aos desinfetantes, que desencadeia um problema em toda cadeia avícola, uma vez que o uso contínuo de um mesmo agente pode promover a seleção de micro-organismos resistentes (Chapmann, 1998), e, embora seja uma preocupação crescente, ainda são escassos os relatos na literatura abordando a resistência microbiana a desinfetantes (McDonnel e Burke, 2011).

Na avicultura, as salmonelas são micro-organismos de notificação obrigatória, por representarem os principais patógenos das aves, estarem distribuídas em todo o mundo e ser amplamente atribuídos a elas grandes prejuízos no setor (Boni et al., 2011). Em frangos de corte, as doenças de maior importância econômica e sanitária são causadas pelos sorotipos Pullorum, Gallinarum, Enteritidis e Typhimurium (Penha et al., 2008), atribuindo a estes sorotipos grande importância avícola.

Para a saúde pública, a *Salmonella* spp. é considerada uma das maiores agentes causadoras de infecções alimentares (Hald et al., 2004) e, embora esteja evidenciada a importância do controle da *Salmonella* no ambiente avícola, poucos estudos são realizados nesse sentido, e quando são, os micro-organismos utilizados nas pesquisas muitas vezes são padrões mundiais (Borowsky et al., 2006). Isto justifica a escolha dos sorotipos utilizados no presente estudo, pelo fato de representarem os de maior incidência em aviários no Oeste do Paraná, serem os mais frequentemente envolvidos em doenças nas aves e humanos e apresentarem resistência ou suscetibilidade conhecida aos antimicrobianos convencionais (dados não publicados) amplamente utilizados na cadeia avícola.

Não foram encontrados estudos na literatura reportando a atividade de desinfetantes frente a *S. Pullorum* e *S. Infantis*, e, por se tratarem de sorotipos patogênicos no setor avícola e de alta incidência, ressalta-se a importância da realização desta pesquisa, a fim de se determine os produtos desinfetantes com potencial realizar o controle desses sorotipos.

De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a eficácia de seis desinfetantes utilizados na avicultura, representados pelo hipoclorito de sódio, amônia quaternária, glutaraldeído e iodo, ácidos orgânicos e ácido peracético frente a cinco sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários de frango de corte localizados na região Oeste do Paraná, Brasil, em três concentrações distintas, bem como avaliar a atividade dos desinfetantes na presença e ausência de matéria orgânica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram pré-selecionados cinco sorotipos de *Salmonella* isolados de granjas avícolas do Oeste do Paraná, Brasil, sendo eles: Typhimurium, Infantis, Enteritidis, Pullorum e Gallinarum, que foram isoladas pelo Laboratório Veterinário MercoLab (Cascavel/PR, Brasil) e a caracterização antigênica completa e identificação de cada sorotipo foram realizadas pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo/SP, Brasil).

Para o preparo do inóculo, as cepas foram ressuspendidas em caldo Infusão de Cérebro Coração (BHI) durante 24 horas, realizados testes bioquímicos padrões, e, após a confirmação, uma alçada do micro-organismo foi semeada em meio de Agar Nutriente (AN) e incubadas a 37 °C por 24 horas. A partir de colônias isoladas, foi preparada uma suspensão de 10<sup>8</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônias), em solução salina 0,85% para a realização dos testes.

Os desinfetantes avaliados foram glutaraldeído, quaternário de amônia, hipoclorito de sódio, iodo, compostos ácidos orgânicos e ácido peracético, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (CR), a metade da concentração (½CR) e dobro da concentração (2CR), diluídos em água destilada estéril.

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de diluição seriada com teste de suspensão segundo metodologia adaptada de Kich et al. (2004) e Jaenisch et al. (2010). Os experimentos foram realizados em duas etapas, como segue, na primeira, tubos de ensaio foram acrescidos de 1 mL da suspensão bacteriana a 10<sup>8</sup> UFC/mL, 1 mL do desinfetante nas concentrações testadas (0,5 CR, CR ou 2 CR) e 250 µL de solução salina 0,85%. Os tubos foram incubados a 35 °C durante 20 minutos. Após o período de incubação, foi acrescido aos tubos 7,75 mL dos desinibidores de cada desinfetante (Tabela 1). Alíquotas de 100 µL de cada tubo foram inoculadas em placas contendo AN e incubadas a 35 °C por 24 horas. Após, realizou-se as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC). No controle foi substituído 1 mL de desinfetante por 1 mL de solução salina 0,85%, e os demais passos realizados nas mesmas condições. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Na segunda etapa, os testes foram realizados sob as mesmas condições citadas anteriormente, substituindo apenas os 250 µL de solução salina da etapa anterior por 250 µL de soro albumina bovina (BSA) 22%, com o intuito de simular a matéria orgânica presente no ambiente. Os dados foram analisados e suas médias apresentadas na Figura 2.

Uma vez que o ambiente de produção de frangos não está livre da presença de matéria orgânica, na segunda etapa do estudo foram realizados experimentos na presença de matéria orgânica (através da utilização do soro albumina bovina 22%), com o intuito de aproximar as condições dos experimentos *in vitro* com o ambiente avícola real, já que é vastamente reportado na literatura que os desinfetantes apresentam sua atividade prejudicada na presença de matéria orgânica (McDonnel e Russel, 1999; Pinheiro et al., 2002; Kich et al., 2004; Stringfellow et al., 2009 e Jaenisch et al., 2010).

Os experimentos foram realizados no delineamento experimental inteiramente aleatorizado, em um esquema fatorial, utilizando com fator principal os desinfetantes (6 níveis) e fator secundário (3 níveis). Os dados foram analisados pelo teste F (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) na presença de interação. As médias obtidas no tratamento controle foram comparadas as demais por contrastes ortogonais ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System, 2003).

**Tabela 1.** Produtos, composição, desinfetantes e diluição de uso recomendadas pelos fabricantes.

| Produto                 | Composição                                      | Desinfetante  | Diluição de uso |
|-------------------------|---|---|-----------------|
| Amônia quaternária      | Cloreto de Alquil dimetil amônio 80g /1000 mL   | Caldo nutriente com 0.5% de tween 80 e lecitina 0.07% | 1:1500          |
| Glutaraldeído           | Glutaraldeído 42.5g Cloreto de Benzalcônio 7.5g | Caldo nutriente com 0.5% de tween 80 e lecitina 0.07% | 1:1000          |
| Hipoclorito de sódio 1% | 10 a 12% de cloro ativo                         | Caldo nutriente com 0.6% de tiosulfato de sódio       | 1:10            |
| Iodóforos               | 2.3% de iodo ativo                              | Caldo nutriente com 0.6% de tiosulfato de sódio       | 1:500           |

|                  |  |  |       |
|------------------|--|--|-------|
| Ácido peracético | Ácido peracético 2% Peróxido de hidrogênio 6% Ácido acético 22%    | Tiosulfato de sódio 2g/litro no meio TSB | 1:200 |
| Ácidos orgânicos | Ácido ascórbico 1 mL, Ácido cítrico 0.475 mL, Ácido láctico 0.475% | 1 mL de NAOH 1N                          | 1:125 |

Fonte: Kich et al. (2004) e Jaenish et al. (2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fatores desinfetantes e concentração avaliados apresentaram interação ( $p < 0,05$ ). Em geral, todos os desinfetantes avaliados promoveram redução significativa nas contagens de micro-organismos em relação ao controle (Tabela 2).

A *S. Typhimurium* apresentou menor contagem de UFC nos desinfetantes à base de glutaraldeído e Hipoclorito de sódio na concentração  $\frac{1}{2}$  CR e CR. (1,90 e 1,99; 1,80 e 1,85), respectivamente. Os quais diferiram da amônia quaternária, iodo e ácidos peracético e orgânicos. Para 2CR, os desinfetantes mais eficientes foram o Glutaraldeído e ácidos orgânicos (0,50 e 0,60) que diferem dos demais tratamentos. Verificou-se que dentre as concentrações, a 2CR é mais eficiente no controle da *S. Typhimurium*. (Tabela 2 e 3).

**Tabela 2.** Resultados das contagens de UFC de *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Infantis*, nas três concentrações testadas dos desinfetantes ( $\frac{1}{2}$ CR, CR e 2CR).

|                      | <i>Salmonella Typhimurium</i> |                  |                 |
|----------------------|-------------------------------|------------------|-----------------|
|                      | $\frac{1}{2}$ CR              | CR               | 2 CR            |
| Controle             |                               | 6.69± 0.08       |                 |
| Amônia quaternária   | 2.78 ± 0.08 C b               | 2.56 ± 0.08 B b  | 1.43 ± 0.08 B a |
| Glutaraldeído        | 1.90 ± 0.08 A b               | 1.80 ± 0.08 A b  | 0.50 ± 0.08 A a |
| Hipoclorito de sódio | 1.99 ± 0.08 A b               | 1.85 ± 0.08 A ab | 1.60 ± 0.08 B a |
| Iodo                 | 4.29 ± 0.08 D b               | 4.13 ± 0.08 C ab | 3.91 ± 0.08 C a |
| Ácido peracético     | 2.48 ± 0.08 B b               | 2.43 ± 0.08 B b  | 1.31 ± 0.08 B a |
| Ácidos orgânicos     | 2.71 ± 0.08 BC c              | 2.14 ± 0.08 B b  | 0.60 ± 0.08 A a |
|                      | <i>Salmonella Infantis</i>    |                  |                 |
| Controle             |                               | 6.70± 0.12       |                 |
| Amônia quaternária   | 2.26 ± 0.12 B a               | 2.36 ± 0.12 B a  | 2.10 ± 0.12 C a |
| Glutaraldeído        | 1.95 ± 0.12 A b               | 1.89 ± 0.12 A b  | 0.50 ± 0.12 A a |
| Hipoclorito de sódio | 1.75 ± 0.12 A a               | 1.60 ± 0.12 A a  | 1.50 ± 0.12 B a |
| Iodo                 | 4.23 ± 0.12 E a               | 4.29 ± 0.12 C a  | 4.18 ± 0.12 D a |
| Ácido peracético     | 3.16 ± 0.12 D a               | 2.62 ± 0.12 B a  | 2.19± 0.12 C a  |
| Ácidos orgânicos     | 2.64 ± 0.12 C b               | 2.53 ± 0.12 B b  | 0.70 ± 0.12 A a |

Para análise, os dados foram transformados em Log x. Médias ( $\pm$  EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si segundo o teste de tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>Ns</sup> Não apresentam diferença significativa em

relação ao tratamento controle, segundo comparações individuais por contrastes ortogonais ( $p < 0,05$ ). Para *S. Typhimurium*  $F=396,49$ ; C.V.= 4.12%;  $P < 0,0001$ . Para *S. Infantis*  $F=58,59$ ; C.V.= 10.%;  $P < 0,0001$

Para *S. infantis*, verificou que O glutaraldeído e hipoclorito de sódio apresentaram menores médias de UFC para  $\frac{1}{2}$  CR e CR (1,95 e 1,75; 1,89 e 1,600, respectivamente, diferindo dos outros tratamentos. Na 2CR, os desinfetantes mais eficientes foram o glutaraldeído (0,50) e os ácidos orgânicos (0,70) que diferiram da amônia quaternária, iodo, hipoclorito de sódio e ácido peracético. Verificou-se que esta concentração é a mais eficiente, por diferir das concentrações CR e  $\frac{1}{2}$  CR.

Já o desinfetante a base de iodo apresentou as maiores contagens de UFC, com as médias variando entre 4,29 a 3,91 para o sorotipo Typhimurium e 4,23 a 4,18 para o sorotipo Infantis, estatisticamente apontado como o menos eficaz no controle dos sorotipos testados, indicando que este não deve ser utilizado como desinfetante nos aviários. Já o hipoclorito de sódio apresentou média semelhante nas concentrações estudadas,

McLaren et al. (2011) avaliaram a eficácia de desinfetantes em três concentrações (0,5 CR, CR e 2 CR) frente a *S. Typhimurium* isoladas de fezes de frangos e demonstraram que o glutaraldeído e amônia quaternária foram capazes de eliminar completamente os micro-organismos, enquanto os desinfetantes a base de ácido peracético e iodo não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Ainda, em estudo realizado com *S. Typhimurium* isoladas de suínos foi observado que os desinfetantes a base de amônia quaternária, iodo, glutaraldeído, hipoclorito de sódio e ácido peracético foram eficazes na eliminação desta bactéria na CR pelo fabricante (Kich et al., 2004). Ressalta-se que em ambas as pesquisas, não foi avaliada a eficácia dos ácidos orgânicos.

Estas discrepâncias entre pesquisas com cepas oriundas de diferentes ambientes de criação e distintas localidades evidenciam a importância de estudos realizados com micro-organismos isolados desses locais, uma vez que em cada ambiente a interação entre os micro-organismos e os produtos desinfetantes pode ser diferenciada. Além disso, as discordâncias podem estar relacionadas a vários

fatores, como diferença de resistência entre as linhagens desafiadoras, as concentrações testadas dos produtos, os tempos de contato, temperatura, concentração dos princípios ativos e a metodologia testada (Borowsky et al., 2006).

**Tabela 3.** Resultados das contagens de UFC de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum nas três concentrações testadas dos desinfetantes ( $\frac{1}{2}$ CR, CR e 2CR).

| <i>Salmonella</i> Enteritidis |                  |                   |                 |
|-------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|
|                               | $\frac{1}{2}$ CR | CR                | 2 CR            |
| Controle                      |                  | 6.42± 0.06        |                 |
| Amônia quaternária            | 3.51 ± 0.06 C a  | 3.28 ± 0.06 C a   | 2.29 ± 0.06 B a |
| Glutaraldeído                 | 3.22 ± 0.06 C a  | 3.16 ± 0.06 C a   | 2.89 ± 0.06 C a |
| Hipoclorito de sódio          | 4.66 ± 0.06 E b  | 4.29 ± 0.06 D a   | 3.98 ± 0.06 D a |
| Iodo                          | 4.18 ± 0.06 D a  | 4.19 ± 0.06 D a   | 4.01 ± 0.06 D a |
| Ácido peracético              | 2.76 ± 0.06 B c  | 2.44 ± 0.06 B b   | 2.02 ± 0.06 B a |
| Ácidos orgânicos              | 2.28 ± 0.06 A c  | 2.01 ± 0.06 A b   | 0.50 ± 0.06 A a |
| <i>Salmonella</i> Pullorum    |                  |                   |                 |
| Controle                      |                  | 5.79± 0.16        |                 |
| Amônia quaternária            | 3.05 ± 0.16 C b  | 1.80 ± 0.16 B a   | 1.07 ± 0.16 B a |
| Glutaraldeído                 | 2.70 ± 0.16 C b  | 1.18 ± 0.16 AB ab | 1.15 ± 0.16 B a |
| Hipoclorito de sódio          | 4.54 ± 0.16 D b  | 1.70 ± 0.16 B a   | 1.16 ± 0.16 B a |
| Iodo                          | 4.54 ± 0.16 D b  | 4.24 ± 0.16 C b   | 3.65 ± 0.16 C a |
| Ácido peracético              | 2.14 ± 0.16 B b  | 1.10 ± 0.16 AB a  | 1.06 ± 0.16 B a |
| Ácidos orgânicos              | 0.50± 0.16 A a   | 0.50± 0.16 A a    | 0.50 ± 0.16 A a |
| <i>Salmonella</i> Gallinarum  |                  |                   |                 |
| Controle                      |                  | 6.76 ± 0.05       |                 |
| Amônia quaternária            | 2.60 ± 0.05 B c  | 2.29 ± 0.05 C b   | 1.59 ± 0.05 B a |
| Glutaraldeído                 | 2.50 ± 0.05 B b  | 2.21 ± 0.05 C a   | 1.82 ± 0.05 B b |
| Hipoclorito de sódio          | 4.91 ± 0.05 D a  | 4.58 ± 0.05 D a   | 4.50 ± 0.05 D a |
| Iodo                          | 4.19 ± 0.05 C b  | 3.99 ± 0.05 D b   | 3.02 ± 0.05 C a |
| Ácido peracético              | 2.71 ± 0.05 B c  | 1.72 ± 0.05 B b   | 0.81 ± 0.05 A a |
| Ácidos orgânicos              | 1.11 ± 0.05 A a  | 0.80 ± 0.05 A a   | 0.70 ± 0.05 A a |

Para análise, os dados foram transformados em Log x. Médias ( $\pm$  EPM) seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>Ns</sup> Não apresentam diferença significativa em relação ao tratamento controle, segundo comparações individuais por contrastes ortogonais ( $p < 0,05$ ). Para *S. Enteritidis*  $F=297,33$ ; C.V.= 3,31%;  $P < 0.0001$ . Para *S. Gallinarum*  $F=139,39$ ; C.V.= 7,90%;  $P < 0.0001$ .

Observou-se que para *S. Enteritidis* os ácidos orgânicos promoveram as menores contagens de UFC nas três concentrações testadas (2,28, 2,01 e 0,50), que diferiram estatisticamente dos demais desinfetantes. A *S. Pullorum*, apresentou mesmo comportamento quanto ao ácido orgânicos, com contagem 0,50 UFC em todas as concentrações. Para a *S. Gallinarum*, na  $\frac{1}{2}$  CR e CR os ácidos orgânicos apresentam menor media de UFC, os quais diferem dos demais tratamentos.. No entanto para 2CR o ácido peracético apresentou menor valor de UFC. Os desinfetantes a base de iodo foram os que apresentaram as maiores contagens de *S. Pullorum* e *S. Enteritidis*.



Para *S. Enteritidis* em estudo de McLarem et al. (2011) foi reportado que desinfetantes a base de iodo não foram capazes de eliminar o micro-organismo, concordando com os dados obtidos na presente pesquisa. Já para *S. Galinarum*, Berchieri Junior e Barrow (1995) verificaram que o desinfetante a base de hipoclorito de sódio apresentou baixa eficiência frente às cepas de *S. Galinarum*, corroborando com o presente estudo.

Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana dos desinfetantes frente aos cinco sorotipos de *Salmonella*, observou-se que a partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, que interação entre os sorotipos e os desinfetantes não apresentaram um padrão de resposta, e, portanto, ressalta-se a importância de testar diferentes sorotipos, uma vez que um único desinfetante não foi eficaz frente a todos os sorotipos testados. Isso se deve provavelmente a elevada variabilidade genética que o gênero *Salmonella* apresenta, resultado de uma interação dinâmica entre os patógenos, o meio ambiente e hospedeiros (Liu, 2011).

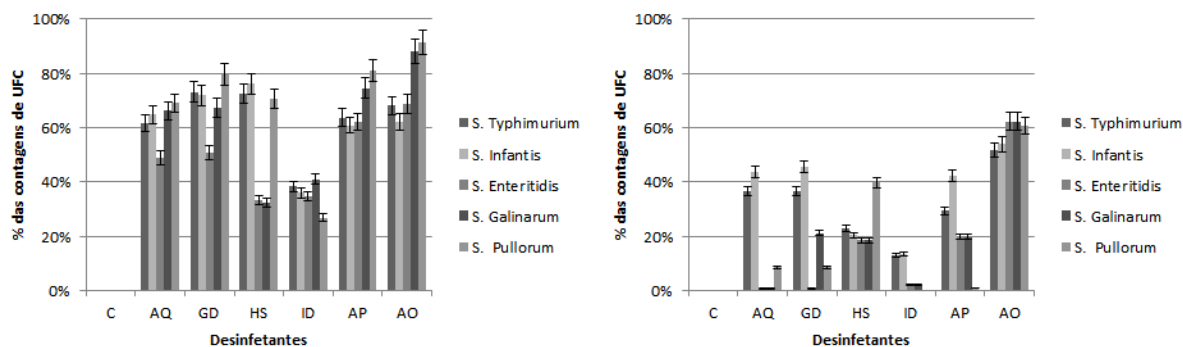
Analisando a susceptibilidade dos sorotipos a antimicrobianos comerciais (Tabela 4) e os resultados encontrados da eficácia dos desinfetantes frente aos sorotipos (Tabela 2 e 3), não foi observada relação entre a resistência aos antimicrobianos e a eficácia dos desinfetantes testados, uma vez que se o perfil de resistência dos sorotipos tivesse relação com a resistência destes frente aos desinfetantes, esperava-se o sorotipo Typhimurium fosse menos susceptível aos desinfetantes, seguido de Infantis, Enteritidis, Pullorum e Galinarum, porém, não foi encontrado este padrão de resposta. Estes resultados concordam com Kich et al. (2004) que ao avaliarem a atividade de desinfetantes frente a *S. Typhimurium* isoladas de suínos, não observaram diferenças de sensibilidade aos desinfetantes entre os grupos de amostras de *S. Typhimurium* multi-resistentes e não multi-resistentes, indicando que a atividade dos desinfetantes está mais relacionada a condições de utilização, como a presença de matéria orgânica e tempo de exposição do que dos perfis de resistência das cepas.

**Tabela 4.** Distribuição dos padrões de resistência de cinco sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários no Oeste do Paraná.

| Padrão de resistência | Sorotipos             |
|-----------------------|-----------------------|
| Gen/Nal/Str/Tet       | Typhimurium           |
| Nal/Str/Tet           | Infantis, Enteritidis |
| Nal/Tet               | Pullorum, Galinarum   |

Gen: gentamicina; Nal: ácido nalidíxico; Str: estreptomicina; Tet: tetraciclina.

Na ausência de matéria orgânica, os desinfetantes a base de ácidos orgânicos, ácido peracético, glutaraldeído e amônia quaternária apresentaram melhor desempenho no controle dos micro-organismos testados (Figura 1).



**Figura 1.** Percentual das contagens de UFC dos sorotipos de *Salmonella* frente à atividade dos desinfetantes. **a** – Na ausência de matéria orgânica, **b** – na presença de matéria orgânica. AP: Ácido Peracético, AO: Ácidos orgânicos, AQ: Amônia Quaternária, GD: Glutaraldeído, HS: Hipoclorito de Sódio, ID: Iodo, C: controle. As barras de erros representam os erros padrões.

Na presença de matéria orgânica (Figura 1-b), todos os seis desinfetantes apresentam sua atividade prejudicada. Porém, o desinfetante a base de ácidos orgânicos apresentou melhor desempenho. Quanto aos demais, suas atividades foram bastante prejudicadas pela presença de matéria orgânica, como já reportado para desinfetantes compostos por amônia quaternária, hipoclorito de sódio, ácido peracético (Jaenisch et al., 2010) iodo e glutaraldeído (Kich et al., 2004).

Diante desses resultados, os ácidos orgânicos demonstraram um grande potencial de uso na avicultura como uma possível alternativa ao uso dos desinfetantes comumente utilizados, com resistência microbiana já relatada e que não são biodegradáveis. Além disso, já foram atribuídos aos ácidos orgânicos

outros aspectos positivos, como sua capacidade de trabalhar em sinergismo com extratos vegetais e óleos essenciais, uma vez que os extratos e óleos podem facilitar a entrada os ácidos orgânicos nas células bacterianas (Lin et al., 2004) que vão agir principalmente através da redução do pH interno, interferindo no transporte de aminoácidos e na inativação de enzimas (Cherrington et al., 1991). Também, podem ser efetivos no controle de salmonelas por de sua adição na ração ou na água de frangos de corte (Pickler et al., 2012) e contribuírem para o ganho de peso dos frangos, quando utilizados em dietas livres de promotores de crescimento (Viola et al., 2008).

Considerando que a avicultura brasileira está em constante expansão, os programas de limpeza e desinfecção das granjas avícolas devem acompanhar tal desenvolvimento, para evitar a disseminação de patógenos, resistência de micro-organismos e alcançar os objetivos pretendidos no quesito desenvolvimento, produtividade e sustentabilidade. Uma alternativa aos programas de biossegurança seria a adoção de um sistema de rodízio de desinfetantes de diferentes princípios ativos e distintos mecanismos de ação com o objetivo de protelar a seleção de micro-organismos resistentes, bem como aumentar o período de eficácia destes. Embora este estudo aponte o desinfetante a base de ácidos orgânicos como melhor alternativa, ressalta-se a importância da constante busca de novos produtos para substituição a aqueles cuja resistência já tenha sido reportada.

## **CONCLUSÃO**

Os desinfetantes a base de ácidos orgânicos, ácido peracético, glutaraldeído e amônia quaternária foram os mais eficazes frente aos sorotipos de *Salmonella* nas três concentrações testadas, na ausência de matéria orgânica. Na presença de matéria orgânica, o desinfetante a base de ácidos orgânicos apresentou o melhor desempenho.

## REFERÊNCIAS

- Berchieri J, Barrow P (1995). The effects of chemical disinfectants and sanitizers on *Salmonella gallinarum*. *Rev. Microbiol.* 26: 246-252.
- Boni FLK, Corrigo AS, Fascina VB (2011). Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 12: 84-95.
- Borowsky LM, Bessa MC, Cardoso MI, Avancini CAM (2006). Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. *Cienc. Rural.* 36: 1474-1479.
- Brasil. Ministério da agricultura e do abastecimento. Instrução Normativa SDA N. 78/2003, De 03 De Novembro De 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 5 nov. 2003.*
- Chapman JS (1998). Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. *Inter. Biodet. Biod.* 41: 241-245.
- Cherrington CA, Hinton M, Chopra I (1991) Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv. Microbiol. Physiol.* 32: 87-108.
- Colla FL, Rodrigues LB, Dickel EL, Borsoi A, Nascimento VP, Santos LR (2012). Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Pesq. Vet. Bras.* 4: 289-292.
- Dominguez PF, Langoni H (2001). *Manejo sanitário animal*. Rio de Janeiro: EPUB, p.210.
- Hald T, Vose D, Weneer HC, Koupeev T (2004). A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 24: 255-269.

Hofer E, Filho SJS, Reis EMF (1997). Prevalência de sorovares de Salmonella isolados de aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 17: 55-62.

Jaenisch FRF, Kuchiishi SS, Coldebella A (2010). Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. *Ciênc. Rural*, 40: 384-388.

Kalil EM, Costa AJF (1994). Desinfecção e Esterilização. *Acta Ortop.* 2: 1-4.

Kich JD, Borowsky LM, Silva VS, Ramenzoni M, Triques N, Kooler FL, Cardozo, MRI (2004). Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de Salmonella Typhimurium Isoladas de suínos. *Acta Sci. Vet.* 32: 33-39.

Lin YT, RG Labbe, K Shetty (2004). Inhibition of Listeria monocytogenes in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5672-5678.

Liu W, Zhu XN, Yu S, Shi XM (2011). Diversity of Salmonella isolates using serotyping and multilocus sequence typing. *Food Microbiol.* 28: 1182-1189.

McLaren I, Wales A, Breslin M, Davies R (2011). Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination. *Avian Patol.* 40: 33-42.

McDonnell G, Russel AD (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 147-179.

McDonnell G, Burke P (2011) Disinfection: is it time to reconsider Spauling?. *J. Hosp. Infect.* 78: 163-170.

Penha GAS, Ueda EY, Santos F, Peres ERP (2008). Diagnóstico da salmonelose e a sua importância para a avicultura: Revisão De Literatura. *Ver. Elet. Med. Vet.* 10: 1-8.

Pickler L, Hayashi RM, Lourenço MC, Miglino LB, Caron LF, Beirão BCB, Silva AVF, Santin E (2012). Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesq. vet. Bras.* 32: 22-31.

Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Honma IF, Ferreira Neto JS, Moraes MZ (2002). Influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes de uso pecuário. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 29: 51-60.

Russell AD (1998). Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J. Hosp. Infect.* 43: 57-68.

SAS (2003). *Statistical Analysis System*, SAS Institute Inc. Cary, USA: SAS Inst.

Stringfellow K, Anderson P, Caldwell D, Byrd L, McReynolds J, Carey J, Nisbet D, Farnell M (2009). Evaluation of disinfectants commonly used by the commercial poultry industry under simulated field conditions. *Poult. Sci.* 88: 1151-1155.

União Brasileira de Avicultura – Relatório anual 2013. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>.

Viola ES, Vieira SL, Torres CA, Freitas DM, Berres J (2008). Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos láctico, fórmico e fosfórico no alimento ou na água. *R. Bras. Zootec.* 37: 296-302.