

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

ELIANA DE ALMEIDA MIRA DE BONA

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE SOROVARIES DE *Salmonella* spp. DE ORIGEM
AVÍCOLA

CASCADEL-PR

Junho/2012

ELIANA DE ALMEIDA MIRA DE BONA

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE SOROVARIES DE *Salmonella* spp. DE ORIGEM
AVÍCOLA

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

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

CASCADEL-PR

Junho/2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central do Campus de Cascavel – Unioeste
Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

D339c

De Bona, Eliana de Almeida Mira

Comparação de métodos de avaliação e atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. / Eliana de Almeida Mira De Bona — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2012.

74 p.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.
Bibliografia.

1. Extratos vegetais – Atividade antimicrobiana. 2. *Salmonella* spp. (Avicultura). I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 576

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIANA DE ALMEIDA MIRA DE BONA

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS VEGETAIS SOROVARES DE *Salmonella* spp. DE ORIGEM AVÍCOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu em
Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível de 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, pela comissão Examinadora composta pelos membros:



Prof.ª Dr.ª Fabiana Gisele da Silva Pinto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente/Orientadora)



Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof.ª Dr.ª Dulcinéia Blum Menezes
Universidade Federal de Pelotas

Aprovada em 16 de março de 2012.

Local da defesa: Unioeste, Prédio de Salas de Aula, sala 56, Cascavel-PR.

Dedicatória

Aos meus familiares e ao meu esposo, por todo amor, dedicação, companheirismo e constante incentivo, com gratidão e amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e permitir que eu realizasse essa conquista.

A minha mãe pela fé, carinho, amor e incentivo, serei eternamente grata.

Ao meu esposo Vanderlei pela paciência, compreensão, incentivo e amor dedicado.

A minha irmã Cristiane pelo amor e incentivo.

Aos meus tios Lauri e Luci, pelo amor, incentivo e disponibilidade durante a minha trajetória.

A minha orientadora Professora Fabiana Gisele da Silva Pinto por sua disponibilidade, empenho, apoio e confiança. Serei eternamente grata por oportunizar esse trabalho.

Ao Professor Luis Francisco Angeli Alves, pelo apoio e sugestões recebidos na elaboração deste trabalho.

A Professora Tereza Cristina Marinho Jorge, por ceder o Laboratório de Farmacognosia e apoiar o desenvolvimento desta pesquisa.

A professora Lívia Godinho Temponi pela disponibilização do Herbário (UNOP) e identificação de todas as plantas.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia Agrícola, pela amizade e pelo apoio durante esses anos.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

A CAPES pela disponibilidade da bolsa de mestrado.

Enfim, obrigado a todos, mesmo àqueles que não tenham sido citados, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	p.1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	p.3
	2.1 Cadeia avícola no Brasil.....	p.3
	2.2 Salmonelose aviária.....	p.4
	2.3 Uso de antimicrobianos sintéticos, resistência antimicrobiana e a contaminação ambiental.....	p.6
	2.4 Antimicrobianos alternativos.....	p.7
	2.5 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana.....	p.9
3.	CAPÍTULO 1: Incidência e resistência antimicrobiana de sorovares de <i>Salmonella</i> de aviários do oeste do Paraná	p. 10
4.	CAPÍTULO 2: Potencial Antimicrobiano de Extratos de Plantas Nativas Brasileiras sobre Sorovares de <i>Salmonella</i> de Origem Aviária	p.23
5.	CAPÍTULO 3: Comparação de Métodos para determinação da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais Aquosos e Etanólicos	p.42
6.	REFERÊNCIAS.....	p.58
7.	ANEXOS	p.64
	Anexo 1 – Normas revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia	p.65
	Anexo 2 – Normas Revista Arquivos do Instituto Biológico	p.70

RESUMO:

Parte deste estudo foi realizado para determinar a incidência e resistência antimicrobiana de sorovares de *Salmonella* isolados a partir de fezes, ração e camas em aviários de frangos de corte na região oeste do Paraná entre os anos de 2003 a 2010. Foram confirmadas 118 amostras de *Salmonella* spp., pertencentes a 38 diferentes sorovares sendo os mais prevalentes: S. Enteritidis, S. Heidelberg e S. Typhimurium. Todos os sorovares de *Salmonella* spp. também foram examinados quanto a resistência a 13 antimicrobianos segundo o método de difusão em disco, verificando-se 82 amostras resistentes em 26 diferentes padrões. Em maior incidência, encontraram-se os multirresistentes a estreptomicina, ácido nalidíxico e tetraciclina. Em outro estudo, voltado à pesquisa de plantas como fonte natural e alternativa de substâncias antimicrobianas, realizou-se testes *in vitro* para testar diferentes métodos de ensaio para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. As metodologias empregadas para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da família Myrtaceae foram os métodos de microdiluição em caldo e de difusão em ágar por poço e por disco, sendo o método de microdiluição em caldo considerado o melhor por ter apresentado maior reprodutibilidade, relação linear entre a concentração do extrato e a atividade inibitória e maior economia de materiais e espaço. Como última etapa da pesquisa utilizou-se, portanto, o método de microdiluição em caldo seguido de repique em placas de ágar, para verificar *in vitro* a inibição bacteriana e a inativação bacteriana determinando-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de diferentes extratos, aquosos ou etanólicos de folhas de 6 plantas nativas encontradas na região Oeste do Paraná, sendo elas: *Maytenus aquifolium* (espinheira-santa), *Myrciaria cauliflora* (jaboticabeira), *Ocotea spixiana* (canela-branca), *Psidium guajava* (goiabeira), e *Ricinus communis* (mamona) e *Schinus molle* (aroeira-branca) frente a 36 *Salmonella* spp., de origem aviária e S. Typhimurium ATCC 14028. Todas as plantas apresentaram alguma atividade seletiva sobre *Salmonella* spp., e os extratos etanólicos apresentaram maior atividade antimicrobiana comparado aos extratos aquosos. Os extratos etanólicos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg e *Psidium guajava* L., apresentaram os melhores resultados. As CIMs variaram entre 1,56-100 mg.mL⁻¹ e a CBM entre 3,13-100 mg.mL⁻¹.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., frangos de corte, resistência/multiresistência, Atividade inibitória, métodos, plantas nativas.

1. Introdução

Devido à intensiva demanda de produção na avicultura e apesar do investimento existente em tecnologias que permitiram o melhoramento da qualidade da carne de frango, esta ainda é passível de contaminação bacteriana, especialmente por micro-organismos do gênero *Salmonella*, uma vez que esse gênero faz parte da microbiota desses animais. A ocorrência e a quantidade de *Salmonella* presente na carne variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças (CARVALHO & CORTEZ, 2005).

A introdução de antimicrobianos para tratar infecções bacterianas há quase 50 anos levou a uma melhoria significativa na produção animal. Porém, com a busca constante por um método eficiente para combater a salmonelose e outras doenças de origem avícola, o uso indiscriminado de antimicrobianos gerou outro problema: a seleção de bactérias resistentes (BUTAYE *et al.*, 2003). Com isso, muitas agroindústrias acatam a proibição ao uso de antimicrobianos que vigoram em países como na União Européia. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2004) proibiu a utilização de diversos antimicrobianos visando manter a exportação de frango aos países da UE.

O surgimento de micro-organismos resistentes a antimicrobianos demonstra que o tratamento de infecções bacterianas não pode se basear no uso de antimicrobianos sem alguma reflexão crítica. Especial atenção tem sido dada ao uso de antimicrobianos em animais, incluindo promotores de crescimento, porque estes antimicrobianos podem contribuir para os problemas com a resistência aos antimicrobianos em seres humanos bem como, a presença de resíduos destes na carne e derivados que podem causar problemas ambientais e à saúde (FULLER, 1989). Isto tem enfatizado a necessidade de introduzir outros métodos de prevenção e tratamento de doenças em aves.

Apesar do empenho da ciência nas buscas de novas formas de controle microbiano, a situação é preocupante principalmente nos países em desenvolvimento, nos quais poucos recursos são empregados no monitoramento de ações sobre o uso racional de antimicrobianos. Dentre os métodos seguros e saudáveis de produção agrícola/agropecuária, está o desenvolvimento de pesquisas por produtos sanitários alternativos, baseados em princípios ativos

vegetais, plantas e minerais no controle de pragas e doenças (DUARTE, 2004; UTIYAMA, 2004).

O uso de preparações a base de plantas é antigo e tem se intensificado nas últimas décadas devido a resultados negativos na medicina convencional, prejuízo causado pelo uso abusivo de medicamentos de origem sintética, falta de acesso aos medicamentos por grande parte da população, pelo crescimento da consciência ecológica e pela crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

No Brasil, foi observado que sorovares de *S. enterica*, isolados de carcaças de aves, apresentaram variações significativas de suscetibilidade aos extratos vegetais de orégano e tomilho (SANTÚRIO *et al.*, 2007). Já pôde ser evidenciado que algumas plantas produzem, em seu metabolismo secundário, substâncias com a capacidade de inibir a atividade de bactérias e outros micro-organismos (DUARTE *et al.*, 2004).

Baseados neste contexto e, tendo em vista a crescente demanda de consumo de carne de frango, a alta incidência de surtos relacionados à salmonelose e a preocupação com a resistência a antimicrobianos, torna-se de grande valia a realização deste estudo para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais sobre *Salmonella*, visando garantir a qualidade de vida da população que consome a carne de frango, bem como a exigência do mercado externo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Cadeia avícola no Brasil

O consumo de carne de aves tem aumentado notoriamente em todo o mundo, sendo que em 2010 a produção de frango no Brasil foi de 11,36 milhões de toneladas alcançando o “ranking” das exportações com 3,81 milhões de toneladas exportadas no mesmo ano. O Paraná foi o estado brasileiro com a maior produção de aves em 2010 responsável por 27,8% do abate de frangos e responsável por 26,2% da exportação de frangos do Brasil no mesmo ano equivalente a mais de 1 milhão de toneladas de carne de frango exportada obtendo a liderança nas exportações a partir de julho de 2011 o que torna a avicultura o segundo item mais forte nas exportações do Paraná, ficando atrás somente do complexo soja. Em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica. Essa posição demonstra o papel cada vez mais fundamental do setor quando inserido na economia do estado (UBABEF, 2011; SINDIAVIAPAR, 2011).

No Brasil, a avicultura emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, com dezenas de milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras. A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. A avicultura possui um papel determinante à economia do Paraná: gera empregos, renda e cria postos de trabalho por todas as áreas do estado, desenvolvendo as regiões do interior e mantendo o trabalhador no campo (SINDIAVIAPAR, 2011).

Fatores como qualidade, sanidade e preço contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor avícola. O Brasil buscou modernização e empregou instrumentos como o manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada. A parceria entre indústria e avicultores também contribuiu para a excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, reduzindo custos na produção e melhorando a qualidade, que atende às demandas de todo o mundo.

2.2. Salmonelose aviária

Dentre as bactérias comumente encontradas em carne de frango, as do gênero *Salmonella* spp., apresentam maior importância na avicultura por representarem risco de contaminação alimentar em seres humanos, uma vez que geralmente as pessoas são infectadas pelo consumo ou contato com alimentos contaminados (DAI PRA, 2009).

Para que os produtos de origem alimentar sejam considerados aptos para consumo humano, a resolução da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 estabelece como padrão de qualidade de alimentos a ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em 25g de alimentos (BRASIL, 2001). *Salmonella*, porém, faz parte da flora normal do intestino das aves; assim, durante o abate, quando não são obedecidos os critérios higiênicos sanitários, esses micro-organismos podem contaminar a carcaça e outras partes com relativa facilidade (SILVA *et al.*, 2001).

O termo salmonelose é utilizado para definir um grupo de doenças causadas por qualquer membro do gênero *Salmonella* que é formado por mais de 2500 sorovares de *Salmonella* capazes de infectar o homem e uma grande variedade de espécies animais (AARESTRUP *et al.*, 2003).

No Brasil, dados epidemiológicos da ANVISA sobre surtos ocorridos entre os anos de 1999 a 2008, relataram 1275 casos de surtos causados por *Salmonella* spp., sendo *Salmonella* Enteritidis o sorovar mais isolado. No Paraná entre 1999 e 2008, dos 399 municípios que compõe o estado, 52 (13,0%) notificaram surtos de salmonelose. Os alimentos mais freqüentes nos surtos de intoxicação alimentar são os ovos crus ou mal cozidos, alimentos mistos e carnes vermelhas (BRASIL, 2008).

Salmonella é um gênero da família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes Gram negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. De acordo com a decisão do Comitê Internacional sobre a Sistemática de Procariotos, o gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella bongori* e *enterica*. Este último inclui seis subespécies, *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* e *salamae* (TINDALL *et al.*, 2005).

Nas aves, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Pullorum (Pulorose) e *Salmonella Gallinarum* (Tifo aviário) determinam doença clínica

característica que pode produzir grandes prejuízos à avicultura. Estas duas salmonelas, assim como *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi em humanos, são hospedeiro-específicas. Já a *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são exceções, como não são espécies específicas podem colonizar o trato gastrointestinal de diferentes espécies. Nas aves, as salmonelas persistem no intestino, sem sinais clínicos, invadem a corrente sanguínea e chegam a diferentes órgãos internos, favorecendo a contaminação de carcaças e ovos (TURNER *et al.*, 1998).

O monitoramento e observação da granja são extremamente importantes para a prevenção da *Salmonella* aviária. De acordo com o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, instrução normativa/DAS nº 3 de 9/01/2002, toda granja de reprodutoras de aves deve ser sorológica e bacteriologicamente monitorada para detecção dos sorovares da doença. Amostra de órgãos, sangue, suabe cloacal, fezes e mecônio devem ser submetidos a exame laboratorial periodicamente para tentativa de isolamento durante o crescimento e durante a produção das aves (BRASIL, 1994).

Dados epidemiológicos da ANVISA relatam que a *S. Enteritidis* é o sorovar com maior taxa de prevalência nos surtos de salmonelose no Brasil nos últimos anos (BRASIL, 2008), sendo o mesmo reportado pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) em Atlanta e pelo Centro de Referência “Robert Koch Institute” na Alemanha (RABSCH *et al.*, 2001).

Ressalta-se que a salmonelose é uma doença de monitoramento e vigilância oficial dentro do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) da Portaria Ministerial nº 193/1994 que preconiza o controle para *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 1994).

A prevenção da salmonelose continua sendo pauta em vários debates do setor avícola. O foco da prevenção da doença por parte dos responsáveis pela criação e abate de aves é recorrente devido ao aumento constante do consumo de carne de frango no Brasil e no mundo. Por este motivo, a preocupação com a salmonelose existe mesmo que bactérias como a *S. Pullorum* e a *S. Galinarum*, específicas de aves, estejam controladas. Outros sorovares, inclusive os que têm

envolvimento com saúde pública, devem ser constantemente monitorados e controlados. Técnicos de diferentes países concordam que é praticamente impossível erradicar a *Salmonella* dos plantéis e que se faz necessário uso de novas tecnologias e adoção de medidas de controle, para combater o problema (SINDIAVIAPAR, 2011).

2.3. Uso de antimicrobianos sintéticos, resistência antimicrobiana e a contaminação ambiental

O tratamento da salmonelose em aves é convencionalmente realizado por antibióticoterapia. A produção de aves convencionais atualmente está pautada na intensa utilização de produtos sanitários, antimicrobianos, probióticos, vacinas e diversos produtos químicos sintéticos. Os promotores de crescimento, responsáveis pelo rápido desenvolvimento de frangos de corte, agem por seu efeito antibacteriano, provavelmente pelas seguintes hipóteses: os nutrientes são protegidos da destruição de bactérias, a absorção de nutrientes é melhorada por causa de um afinamento da barreira intestinal, os antimicrobianos diminuem a produção de toxinas pelas bactérias intestinais, ou ainda, pode haver redução na incidência de infecções subclínicas intestinal (BUTAYE *et al.*, 2003).

Entretanto o uso intensivo e inadequado provoca o desenvolvimento de população bacteriana resistentes a diversos princípios ativos, bem como, causam diversos problemas ambientais e à saúde dos produtores e consumidores pela presença de resíduos destes na carne e derivados (FULLER, 1989; BILA & DEZOTTI, 2003; SAKARIDIS *et al.*, 2011).

Além da utilização de antimicrobianos na nutrição animal, uma série de práticas humanas tem levado as bactérias à resistência a antimicrobianos, como o uso extensivo, errôneo e indiscriminado de antimicrobianos pelos médicos; o uso de antimicrobianos em pacientes imunodeprimidos para prevenir infecções; a dificuldade dos pacientes em seguir o tratamento prescrito; o transporte de bactérias resistentes a novas áreas em função das viagens no mundo (TORTORA *et al.*, 2000).

Elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos são registradas em estudos realizados no mundo todo e na medicina humana e veterinária (MANIE *et*

al., 1997; MOTA *et al.*, 2005). Para *Salmonella*, também, há registros de alta resistência aos princípios antimicrobianos normalmente utilizados em avicultura (CORTEZ *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Genes resistentes, adquiridos por micro-organismos, podem ser facilmente transferidos para organismos de diferentes ecossistemas, sendo levados da água para o solo e vice-versa (BILA & DEZOTTI, 2003). No meio aquático, o contato físico entre as bactérias possibilita alta frequência de troca de plasmídeos codificadores de resistência aos antimicrobianos (RHODES *et al.*, 2000).

A resistência a antimicrobianos pode ocorrer pela inativação do composto por enzimas desintoxicantes, redução da permeabilidade celular ou expulsão da droga por bombas específicas ou não-específicas e modificação dos alvos dos antimicrobianos. Além disso, as bactérias podem adquirir um fenótipo de resistência via reguladores transcricionais globais ou específicos. Estes mecanismos podem ser induzidos pelo antibiótico em si ou por sinais ambientais (BARBOSA & LEVY, 2000; BOERLIN & REID-SMITH, 2008).

Além do fator de resistência, Barbosa e Levy (2000) mencionam que resíduos de antimicrobianos excretados nas fezes em uma área particular podem ter impacto sobre os ecossistemas geograficamente distantes, bem como eles podem ser facilmente dispersos em solo e águas através de esgoto, estrume, etc.

Ressalta-se a importância de compreender o mecanismo de resistência microbiana, bem como na busca de novos compostos antimicrobianos, sintéticos ou naturais, no intuito de controlar a ação de micro-organismos patogênicos (CASTRO *et al.*, 2002).

2.4. Antimicrobianos alternativos

Os extratos vegetais podem ser uma importante alternativa em substituição aos antimicrobianos promotores de crescimento nas rações. Estudos adicionais são fundamentais para o rápido desenvolvimento desta questão, de significativo impacto sobre a avicultura brasileira (SANTURIO *et al.*, 2007).

A forma de ação dos princípios ativos de extratos vegetais sobre as células bacterianas são muito similares ao dos antimicrobianos convencionais. Pesquisas já comprovaram que algumas plantas produzem em seu metabolismo secundário,

substâncias com a capacidade de inibir a atividade de bactérias e de outros micro-organismos (DUARTE, 2004).

A diversidade química associada à diversidade biológica encontrada em ecossistemas terrestres e aquáticos é um importante aspecto a ser considerado em processos e diretrizes de desenvolvimento de novos biofármacos. Como característica geral, os compostos vegetais mostram um padrão de ocorrência restrito a alguns grupos taxonômicos, não sendo considerados essenciais ao metabolismo basal da célula vegetal, donde surge a denominação metabólitos secundários (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999).

Segundo Ferronato *et al.* (2007), deve-se enfatizar a busca por antimicrobianos de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo vastamente testadas e utilizadas há dezenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro.

O cultivo e produção de extratos por pequenos produtores é uma alternativa agroecológica, baseada em um cultivo sustentável, que respeita o meio ambiente, em oposição ao modelo agrícola convencional, centrado na exploração e uso de agroquímicos. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabelece diretrizes para o desenvolvimento de ações voltadas ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira entre outras providências (BRASIL, 2007).

Além dos extratos desempenharem um importante papel, garantindo a sobrevivência das espécies no ecossistema, metabólitos secundários são utilizados em escala industrial para a produção de inseticidas, corantes, flavorizantes, aromatizantes e medicamentos (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999).

Entre os trabalhos já realizados sobre a atividade inibitória de extratos vegetais frente a *Salmonella* spp., encontra-se o realizado por Wiest *et al.* (2009), que constataram entre 86 plantas, em extratos aquosos ou alcoólicos/hidroalcoólicos, 58% apresentaram alguma inibição ou inativação sobre *Salmonella* sp.

Com esta perspectiva, é fundamental avaliar, a partir de técnicas microbiológicas modernas e padronizadas, a atividade de extratos vegetais sobre diferentes sorovares de *Salmonella*.

2.5 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais, sendo que os mais conhecidos incluem: método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição que são realizados em caldo (OSTROSKY *et al.*, 2008). Os métodos de diluição em caldo ou difusão em ágar são técnicas usualmente aceitas internacionalmente para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano, sendo estas técnicas padronizadas para o uso de antimicrobianos comerciais (CLSI, 2003; CLSI, 2006).

Pesquisas realizadas anteriormente por diversos autores com o objetivo de avaliar métodos de avaliação de extratos vegetais, sugerem uso de diferentes metodologias para que os resultados possam ser comparados com estudos de diferentes grupos de pesquisas (ZGODA & PORTER, 2001; OSTROSKY *et al.*, 2008; OTHMAN *et al.*, 2011). Contudo, ainda não existe uma padronização para a utilização das técnicas.

1 **3. CAPÍTULO 1: Incidência e resistência antimicrobiana de sorovares de Salmonella de**
2 **aviários do oeste do Paraná**

3
4 **Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

5
6 **Incidência e resistência antimicrobiana de sorovares de *Salmonella* de aviários do oeste**
7 **do Paraná**

8 *Incidence and antimicrobial resistance of Salmonella serovars of aviaries the West of Parana*

9
10 **RESUMO**

11 Este estudo foi realizado para determinar a incidência e resistência antimicrobiana de
12 sorovares de *Salmonella* isolados a partir de fezes, ração e camas em aviários de frangos de
13 corte na região oeste do Paraná entre os anos de 2003 a 2010. Foram confirmadas 118
14 amostras de *Salmonella* spp., pertencentes a 38 diferentes sorovares sendo os mais
15 prevalentes: *S. Enteritidis* (16,1%), *S. Heidelberg* (5,9%), *S. Typhimurium* (5,9%), *S. Hadar*
16 (5,0%), *S. Albany* (4,2%), *S. Enterica* (4,2%) e *S. Saintpaul* (4,2%). Todos os sorovares de
17 *Salmonella* spp. também foram examinados quanto a resistência a 13 antimicrobianos
18 segundo o método de difusão em disco. Trinta e seis amostras (30,5 %) foram suscetíveis a
19 todos os antimicrobianos e entre as 82 amostras resistentes foram verificados 26 diferentes
20 padrões. Em maior incidência, encontraram-se os multirresistentes a estreptomicina, ácido
21 nalidíxico e tetraciclina (20,7%), a ácido nalidíxico (13,4%) e a ácido nalidíxico e tetraciclina
22 (11,0%). Os resultados deste estudo demonstram uma elevada incidência de *Salmonella* spp.
23 em ambiente de criação de frangos e uma grande porcentagem de amostras resistentes aos
24 antimicrobianos convencionais.

25 PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella* spp., incidência, frangos de corte,
26 resistência/multiresistência, Paraná

27 **ABSTRACT**

28 *This study was conducted to determine the prevalence and antimicrobial resistance of*
29 *Salmonella serovars isolated from feces, feed and bedding in broiler chicken farms in western*
30 *Paraná between the years 2003 to 2010. There were 118 confirmed Salmonella spp.,*
31 *belonging to 38 different serovars were the most prevalent: S. Enteritidis (16,1%), S.*
32 *Heidelberg (5,9%), S. Typhimurium (5,9%), S. Hadar (5,0%), S. Albany (4,2%), S. Enterica*
33 *(4,2%) and S. Saintpaul (4,2%). All serovars of Salmonella spp. were also examined for*
34 *resistance to 13 antimicrobials according to the disk diffusion method. Thirty-six samples*

35 (30.5%) were susceptible to all antimicrobials and between the 82 strains resistant 26
36 different patterns were observed. In the highest prevalence, we found the multiresistant
37 streptomycin, nalidixic acid and tetracycline (20.7%), nalidixic acid (13.4%) and nalidixic
38 acid and tetracycline (11.0%). The results of this study demonstrate high prevalence of
39 *Salmonella* spp. environment of chicken and a large percentage of strains resistant to
40 conventional antibiotics.

41 **KEY-WORDS:** *Salmonella* spp., incidence, Resistance/multidrug resistance, broilers, Parana.

42

43

INTRODUÇÃO

44

45 O Paraná, no ano de 2010, foi responsável por 27 % do abate e 26 % da exportação de frangos
46 no Brasil alcançando destaque no setor (UBABEF, 2011). A qualidade, sanidade e preço
47 foram os principais fatores que contribuíram para melhorar a produtividade. Contudo, as aves
48 ainda são passíveis de contaminação por patógenos, como pelas bactérias do gênero
49 *Salmonella*, que são responsáveis por prejuízos à indústria avícola (SINDIAVIPAR, 2011).

50 Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entre os anos de 1999 a
51 2008, 42,9% dos surtos de intoxicações alimentares ocorridos no Brasil atribui-se a
52 salmonelose, sendo notificada no Paraná em 13% dos municípios. Os ovos, carnes e derivados
53 são os alimentos mais frequentes relacionados aos surtos (Brasil, 2008).

54 Técnicos de diferentes países concordam que é praticamente impossível erradicar a
55 *Salmonella* dos plantéis e controlar a sua transmissão em virtude de sua capacidade de
56 colonizar o trato digestório dos animais e por apresentar grande número de reservatórios
57 envolvidos na excreção fecal e contaminação ambiental. Todos os sorovares, inclusive os que
58 têm envolvimento com saúde pública, devem ser constantemente monitorados e controlados
59 (Andreatti-Filho et al., 2009; SINDIAVIPAR, 2011).

60 O uso de antimicrobianos contribuiu para melhorar a sanidade avícola e reduzir o tempo de
61 criação, porém seu uso indiscriminado proporcionou a seleção e incidência de diferentes
62 sorovares de *Salmonella* e outros micro-organismos resistentes a antimicrobianos, reduzindo
63 sua efetividade em casos clínicos além de contribuir para a presença de resíduos destes na
64 carne e derivados (Bila e Dezotti, 2003; Sakaridis et al., 2011).

65 Em diversas partes do mundo, foram isolados sorovares de *Salmonella* de origem aviária, com
66 resistência a distintos grupos de antimicrobianos. Nesse sentido, destacam-se estudos em que
67 foram encontrados isolados de *Salmonella* spp. com altas taxas de resistência, no Brasil
68 (Cardoso et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Duarte et al., 2009; Souza et al., 2011), assim como

69 na Espanha (Carramiñana et al., 2004), Holanda (Hasman et al., 2005), Lituânia (Ruzauskas
70 et al., 2005), Nigéria (Okoli et al., 2006), Estados Unidos (Alali et al., 2010) e Grécia
71 (Sakaridis et al., 2011). Estes estudos afirmam que as salmonelas de origem aviária são
72 resistentes a uma grande gama dos antimicrobianos mais comumente usados e confirmam que
73 as aves são um importante reservatório de *Salmonella* multirresistentes. Além disso, tem-se
74 observado também nas últimas décadas a propagação da resistência através de toda a
75 população bacteriana e nichos ecológicos (Boerlin e Reid-Smith, 2008).

76 Assim, este estudo busca ampliar o conhecimento sobre a incidência e a resistência
77 antimicrobiana de *Salmonella* isoladas de granjas de frango de corte no Paraná, visto que não
78 há informações sobre incidência de *Salmonella* no Estado, em aviários de frango de corte, que
79 é fonte de contaminação e origem dos sorovares envolvidos. O objetivo do trabalho foi
80 determinar a incidência e resistência antimicrobiana de sorovares de *Salmonella* isolados a
81 partir de aviários de criação de frangos de corte no Oeste do Paraná dos últimos oito anos.

82

83

MATERIAL E MÉTODOS

84

85 Foram analisadas 118 amostras de *Salmonella* isoladas de fezes (suabe de cloaca), cama
86 (suabe de arrasto) e rações (farinhas/insumos de rações) de frango de corte entre 2003 e 2010,
87 provenientes de diferentes aviários da região Oeste do Paraná, Brasil, fornecidas pelo
88 Laboratório Veterinário MercoLab, Cascavel, PR Brasil, sendo sua caracterização antigênica
89 completa e identificação de sorovar realizadas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

90 As amostras foram recuperadas em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA[®]) a 37°C
91 por 18h antes do teste. Avaliou-se a suscetibilidade antimicrobiana de acordo com as
92 recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2007). Os
93 agentes antimicrobianos testados foram (LABORCLIN[®]): ácido nalidíxico (30 µg),
94 ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), cefalotina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg),
95 enrofloxacina (10 µg), estreptomicina (10 µg), imipenem (10 µg), gentamicina (10 µg),
96 norfloxacina (10 µg), sulfazotrin (25 µg), tetraciclina (30 µg) e tobramicina (10 µg). Todas as
97 amostras que apresentaram resistência intermediária foram agrupadas com as amostras
98 sensíveis para evitar superestimacão da resistência. Utilizaram-se como cepas referência,
99 *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (American Type Culture Collection) e *Escherichia*
100 *coli* ATCC 25922. Os resultados obtidos foram comparados com os dados da Tabela 2A, do
101 documento M100-S17 do CLSI (2007). Foram consideradas multirresistentes as amostras
102 resistentes a 3 ou mais antimicrobianos.

103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que as 118 amostras analisadas pertenciam a 38 diferentes sorovares, sendo os mais prevalentes *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Albany*, *S. Enterica* e *S. Saintpaul* (Tab.1).

Os resultados se encontram de acordo com estudos prévios realizados por outros pesquisadores, que confirmam a prevalência de *S. Enteritidis* em diversas regiões do Brasil, incluindo o estado do Paraná (Souza et al., 2011), São Paulo (Hofer et al., 1998; Lima et al., 2009), os Estados da Bahia, Ceará, Goiás, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina (Kanashiro et al., 2005), Rio Grande do Sul (Ribeiro et al., 2007), e Nordeste (Duarte et al., 2009). Da mesma forma, em outros países foi igualmente observada a prevalência de *S. Enteritidis*, nos isolados de aves de corte em Portugal (Antunes et al., 2003), na Espanha (Carramiñana et al., 2004) e na Lituânia (Ruzauskas et al., 2005).

Todas as salmonelas podem causar infecções extra-intestinais, sendo que os sorovares mais prevalentes como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* estão normalmente associados a casos de infecções em humanos por estarem em um número elevado dentre a população de *Salmonella* (Su e Chiu, 2007).

Quanto à origem das amostras de *Salmonella* spp., foram observadas 73 isolados de cama de aviários (61,9 %), 23 de rações/insumos de aves (19,5%) e 22 de fezes de aves (18,6%) (Tab. 1). Ressalta-se que há poucos estudos realizados sobre a incidência de *Salmonella* em camas, fezes e rações de frango no Brasil, sendo um dos poucos estudos realizados em fezes e carcaça de aves de corte no estado do Ceará, Brasil, mostrou que apenas as amostras isoladas de carcaças estavam contaminadas, constatando que os aviários analisados estavam livres de infecção por *Salmonella*, diferentemente dos aviários analisados no atual estudo (Oliveira et al., 2006).

Tabela 1. Distribuição de 118 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de granjas de frangos de corte, de acordo com a incidência e fonte de isolamento no período entre 2003 a 2010, na região Oeste do Paraná, Brasil.

Sorovar	Nº (%)	fezes	cama	ração/insumos
Enteritidis	19 (16,1)	6	9	4
Heidelberg	7 (5,9)	2	3	2
Typhimurium	7 (5,9)	1	5	1
Hadar	6 (5,0)	1	4	1
Albany	5 (4,2)	2	2	1
Enterica	5 (4,2)	2	3	0
Saintpaul	5 (4,2)	2	2	1
Derby	4 (3,4)	0	3	1
Mbandaka	4 (3,4)	1	3	0
Newport	3 (2,5)	1	2	0
Infantis	3 (2,5)	0	3	0
Tennessee	3 (2,5)	1	2	0
Livingstone	3 (2,5)	0	3	0
Kentucky	3 (2,5)	0	3	0
Give	2 (1,7)	0	1	1
Anatum	2 (1,7)	0	2	0
Panamá	2 (1,7)	0	0	2
Schwarzengrund	2 (1,7)	0	2	0
Corvallis	2 (1,7)	0	0	2
Gallinarium	2 (1,7)	0	1	1
Brandenburg	2 (1,7)	0	2	0
Cerro	2 (1,7)	1	1	0
Braenderup	2 (1,7)	0	1	1
Montevideo	2 (1,7)	0	2	0
Ohio	2 (1,7)	0	2	0
Agona	2 (1,7)	0	2	0
Senftenberg	2 (1,7)	0	0	2
Gafsa	2 (1,7)	0	0	2
Cubana	2 (1,7)	1	1	0
Lexigton	2 (1,7)	1	1	0
Minnesota	2 (1,7)	0	2	0
Pullorum	1 (0,8)	0	1	0
Muenchen	1 (0,8)	0	1	0
Rissen	1 (0,8)	0	0	1
Morehead	1 (0,8)	0	1	0
Worthington	1 (0,8)	0	1	0
Grumpensis	1 (0,8)	0	1	0
Orion	1 (0,8)	0	1	0
Total	118 (100)	22 (18,6)	73 (61,9)	23 (19,5)

138

139 A incidência de *Salmonella* spp. também foi relatada em isolados de fezes por Kottwitz et al.
 140 (2008), no Paraná, com prevalência do sorovar *S. Enterica* e, ao contrário desta pesquisa, não
 141 isolaram nenhuma *S. Enteritidis*.

142 Quanto às amostras de cama observou-se no atual estudo, 33 diferentes sorovares de amostras
 143 de cama, sendo *S. Enteritidis* o sorovar mais frequente, seguido de *S. Typhimurium*, *S. Hadar*,
 144 *S. Heidelberg*, *S. Enterica*, *S. Derby*, *S. Mbandaka*, *S. Infantis*, *S. Livingstone* e *S. Kentucky*
 145 (Tab.1). Corroborando os resultados, Andreatti Filho et al. (2009) reportaram no Estado de

146 São Paulo, Brasil, isolados como *S. Enteritidis*, *S. Infantis* e *S. Kentucky* presentes em cama de
147 aviários.

148 A contaminação da cama de aviário torna-se um problema para a cadeia avícola, visto que, ao
149 estar infestada por *Salmonella*, há a propensão de se transmitir às aves e posteriormente, aos
150 seres humanos através do consumo da carne e derivados, de forma que o controle da
151 disseminação de *Salmonella* é dependente do controle das fontes de transmissão (Frederick e
152 Huda, 2011).

153 Em relação à ração, 23 sorovares foram isolados sendo os mais frequentes *S. Enteritidis*, *S.*
154 *Heidelberg*, *S. Panamá*, *S. Corvallis*, *S. Senftenberg* e *S. Gafsa* (Tab. 1).

155 No entanto, Hofer et al. (1998) verificaram diferentes sorovares isolados de matérias-primas e
156 de ração em sete regiões distintas do Brasil, sendo os mais frequentes: *S. Montevideo*, *S.*
157 *Senftenberg*, *S. Havana*, *S. Mbandaka*, *S. Tennessee*, *S. Infantis* e *S. Agona*. Os autores
158 mencionam que o elevado número de sorovares reconhecidos, provavelmente, decorre da
159 mistura de um grande número de insumos de diferentes origens no preparo da ração.

160 Observou-se que apenas 36 amostras (30,5 %) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos,
161 sendo aquelas que apresentaram maior sensibilidade: oriundas da ração (13/23), amostras de
162 cama (20/73) e fezes (3/22), ou seja, as amostras isoladas de fezes e cama apresentam-se
163 resistentes a um número maior de antimicrobianos por amostra (Tab. 2).

Tabela 2. Origem, suscetibilidade e resistência a antimicrobianos de 118 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de aviários de frango de corte no Oeste do Paraná no período de 2003 a 2010.

Nº de antimicrobianos (Resistência)	Origem e Nº de amostras			
	Fezes	Cama	Ração/Insumo	Nº Total (%)
Suscetível	3	20	13	36 (30,5)
1	3	8	4	15 (12,7)
2	3	14	5	22 (18,6)
3	6	23	1	30 (25,4)
4	5	9	0	14 (11,9)
5	1	0	0	1 (0,8)

164
165 Observou-se que 35 amostras apresentaram multirresistência, sendo que, 25,2% do total de
166 amostras apresentaram multirresistência a 3 antimicrobianos, 11,9% a 4 antimicrobianos e
167 0,8% a 5 antimicrobianos (Tab. 2).

168 Em relação as 82 amostras que apresentaram resistência, 54,2% são reportadas a tetraciclina,
169 44,9% ao ácido nalidíxico, 37,2% a estreptomicina, 11,9% a ampicilina, 6,8% ao
170 cloranfenicol, 5,9% a gentamicina e 3,4% a cefalotina (Tab. 3).

171 Nenhum sorovar apresentou resistência à tobramicina e as menores taxas de resistência se
172 atribuíram à imipenem e sulfazotrin, juntamente com enrofloxacina, ciprofloxacina e
173 norfloxacina (três fluoroquinolonas), ao contrário do ácido nalidíxico (1ª geração de

174 quinolonas). Estes dados concordam com Sakaridis et al. (2011), que verificaram a
175 suscetibilidade de amostras de *Salmonella* frente aos antimicrobianos enrofloxacina e
176 ciprofloxacina e altas taxas de resistência a tetraciclina, ácido nalidíxico e estreptomicina.

177 No atual estudo, foram verificados 26 diferentes padrões de resistência antimicrobiana,
178 embora, nenhuma das amostras testadas apresentou 100% de resistência aos antimicrobianos
179 utilizados (Tab. 3).

180 Observou-se ainda que 11 padrões foram associados a somente um sorovar, enquanto os
181 outros padrões foram associados a dois ou mais sorovares. Em maior incidência encontraram-
182 se os multirresistentes a estreptomicina, ácido nalidíxico e tetraciclina (20,7%), os que
183 apresentaram resistência somente ao ácido nalidíxico (13,4%) e os que apresentaram
184 resistência a ácido nalidíxico e tetraciclina (11,0%). Contudo, nos Estados Unidos foi
185 observado que nenhuma das salmonelas isoladas de amostras de fezes e ração de aves foi
186 resistente ao ácido nalidíxico ou ciprofloxacina (Alali et al., 2010). O ácido nalidíxico foi a
187 primeira quinolona produzida com atividade antimicrobiana em enterobactérias e amplamente
188 utilizada no Brasil (Silva e Hollenbach, 2010).

189 Exceto uma amostra, *S. Lexington*, todos os sorovares resistentes a ampicilina também
190 apresentaram resistência a tetraciclina, sendo que apenas duas amostras resistentes a
191 estreptomicina não apresentaram resistência a tetraciclina.

192 Nos sorovares que podem produzir grandes prejuízos à avicultura como *S. Gallinarum*, que
193 determina uma doença clínica conhecida como febre tifóide e *S. Pullorum*, causador da
194 pulorose, foi observado resistência a tetraciclina e ácido nalidíxico. Em trabalho realizado por
195 Lima et al.(2009) quanto a suscetibilidade antimicrobiana de amostras isoladas de produtos
196 avícolas, os mesmos sorovares apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, porém,
197 sensibilidade a tetraciclina.

198 Uma amostra de *S. Mbandaka* apresentou resistência a 5 diferentes antimicrobianos e duas *S.*
199 *Newport* a 4 antimicrobianos. Okoli et al. (2006), na Nigéria, avaliaram amostras de ração de
200 aves comerciais para determinar a frequência de isolamento de *Salmonella* sp. e os seus perfis
201 de resistência frente a 14 antimicrobianos e verificaram 8 diferentes padrões de resistência
202 variando de 3 a 8 antimicrobianos. As taxas de resistência aos mesmos antimicrobianos foram
203 maiores às aqui obtidas, sendo registrado alta taxa de resistência à ampicilina e tetraciclina,
204 moderada à cloranfenicol e baixa resistência para a ciprofloxacina. Por outro lado, difere desta
205 pesquisa por apresentar todas as amostras sensíveis à gentamicina, estreptomicina e ácido
206 nalidíxico. Tais diferenças podem estar relacionadas a incidência de determinadas amostras
207 em distintas regiões geográficas, visto que os autores não descreveram os sorovares, mas

208 também pode ser atribuído a diferença na suscetibilidade das aves aos antimicrobianos ou ao
 209 controle sanitário local deficiente.

210

Tabela 3. Distribuição dos padrões de resistência de 82 amostras de *Salmonella* spp isoladas de fezes, rações/farinhas para aves e cama de aviários no Oeste do Paraná.

Padrão de resistência*	Nº (%)	Sorovares
Tet	4 (4,9)	Enterica (1), Mbandaka (1), Cubana (1), Derby (1)
Nal	11 (13,4)	Enteritidis (7), Heidelberg (1), Kentucky (1), Minnesota (2)
Amp, Cef	1 (1,2)	Lexington (1)
Gen, Nal	4 (4,9)	Typhimurium (3), Infantis (1)
Tet, Amp	1 (1,2)	Agona (1)
Tet, Str	7 (8,5)	Hadar (1), Derby (3), Corvalis (1), Enterica (1), Panama (1)
Tet, Nal	9 (11,0)	Enteritidis (1), Hadar (3), Muenchen (1), Gallinarium (1), Pullorum (1), Infantis (1), Cubana (1)
Amp, Cef, Tet	2 (2,4)	Livingstone (2)
Tet, Cef, Imi	1 (1,2)	Give (1)
Str, Nal, Tet	17 (20,7)	Typhimurium (3), Enteritidis (6), Hadar (2), Kentucky (1), Enterica (2), Infantis (1), Tennessee (2)
Tet, Nal, Enr	2 (2,4)	Enteritidis (2)
Nal, Str, Clo	1 (1,2)	Saintpaul (1)
Amp, Str, Tet	5 (6,1)	Heidelberg (5)
Amp, Nal, Tet	2 (2,4)	Albany (2)
Amp, Str, Tet, Nor	1 (1,2)	Mbandaka (1)
Amp, Str, Tet, Clo	1 (1,2)	Mbandaka (1)
Nal, Str, Enr, Nor	1 (1,2)	Newport (1)
Nal, Str, Tet, Gen	1 (1,2)	Typhimurium (1)
Nal, Str, Tet, Clo	3 (3,6)	Saintpaul (1), Schwarzengrund (1), Enterica (1)
Nal, Str, Tet, Enr	1 (1,2)	Anatum (1)
Nal, Str, Enr, Cip	1 (1,2)	Newport (1)
Nal, Str, Tet, Sul	2 (2,4)	Saintpaul (1), Anatum (1)
Str, Tet, Gen, Clo	2 (2,4)	Albany (2)
Str, Tet, Clo, Sul	1 (1,2)	Montevideo (1)
Str, Tet, Amp, Nor, Cip	1 (1,2)	Mbandaka (1)

*36 amostras foram sensíveis aos antimicrobianos testados; Tob: Tobramicina; Imi: Imipenem; Gen: gentamicina; Nal: ácido nalidíxico; Sul:sulfazotrin; Tet: tetraciclina; Cef: cefalotina; Str: estreptomicina; Enr: enrofloxacin; Amp: ampicilina; Cip: ciprofloxacina; Clo: cloranfenicol; Nor: norfloxacina.

211

212 Entre os 18 sorovares de *S. Enteritidis* isolados, 16 (88,9%) apresentaram resistência a
 213 tetraciclina e/ou ácido nalidíxico e 6 (33,3%) a estreptomicina (Tab. 3). Estes resultados
 214 concordam com Vaz et al. (2010), que isolaram *S. Enteritidis* de surtos de salmonelose e
 215 produtos relacionados a aves e reportaram menores taxas de resistência a ácido nalidíxico,
 216 estreptomicina e tetraciclina. Além disso, semelhantemente ao presente trabalho, todos os
 217 sorovares foram suscetíveis à ampicilina, ciprofloxacina e cloranfenicol. Também, Cardoso et
 218 al. (2006) mencionam, além de ciprofloxacina, suscetibilidade a gentamicina, norfloxacina e
 219 sulfazotrin, semelhante aos nossos resultados.

220 Ressalta-se que *S. Enteritidis* emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública
 221 no Brasil a partir de 1993, introduzido, provavelmente, pela importação, no final da década de
 222 80, de ovos férteis de galinha e pintos de um dia contaminados. Além disso, a rápida
 223 expansão da avicultura brasileira na década de 1990, concomitante com o uso indiscriminado

224 de antimicrobianos em aves criou condições favoráveis para a manutenção e proliferação da
225 *S. Enteritidis*, bem como induziu a manutenção de lotes positivos para *S. Enteritidis* (Peresi,
226 1998; Silva e Duarte, 2002).

227 Os seis sorovares de *S. Hadar* apresentaram resistência a três diferentes padrões de
228 multirresistência, tetraciclina-ácido nalidíxico, estreptomicina-ácido nalidíxico-tetraciclina e
229 tetraciclina-estreptomicina. Os resultados desta pesquisa corroboram com os valores
230 anteriormente relatados por Antunes et al. (2003) e Ribeiro et al. (2006), que embora tenham
231 realizados trabalhos com carcaças e outros produtos de aves, verificaram que todos os
232 isolados de *S. Hadar* (100%) apresentavam resistência aos antimicrobianos testados, com
233 elevadas taxas de resistência a tetraciclina, ácido nalidíxico, enrofloxacina e estreptomicina.

234 Assim como *S. Hadar*, todos os sorovares de *S. Typhimurium* apresentaram três diferentes
235 padrões de multirresistência sendo: gentamicina-ácido nalidíxico, estreptomicina-ácido
236 nalidíxico-tetraciclina e ácido nalidíxico-estreptomicina-tetraciclina-gentamicina. Bauer-
237 Garland et al. (2006) verificaram a transmissão de *S. Typhimurium* multirresistente e
238 sensível, observando que salmonelas multirresistentes são mais virulentas sob pressão de
239 seleção permitindo que elas se espalhem mais rapidamente de animal para animal e também
240 respondem mal ao tratamento antimicrobiano.

241 Já, o sorovar *S. Heidelberg* apresentou uma amostra com resistência a somente ácido
242 nalidíxico e 5 sorovares com multirresistência a ampicilina-estrptomicina-tetraciclina.

243 Assim, verifica-se a clara necessidade de se aplicar restrições sobre o uso de antimicrobianos
244 na avicultura, e nesse sentido, nas últimas décadas, tem-se visto evolução significativa na
245 preocupação do consumidor na compra de produtos cuja produção garanta a segurança
246 ambiental e alimentar, como os alimentos orgânicos. Além disso, a elevada taxa de resistência
247 aos antimicrobianos testados ressalta, também, a importância da busca de novos compostos,
248 sintéticos ou naturais, no intuito de controlar a ação de micro-organismos patogênicos por
249 métodos seguros e saudáveis de produção agrícola/agropecuária.

250

251

CONCLUSÕES

252

253 Os sorovares de *Salmonella* compõem diferentes padrões de resistência apresentando grande
254 variação na sensibilidade e elevada resistência aos antimicrobianos testados, principalmente a
255 tetraciclina e ao ácido nalidíxico. Os dados obtidos enfatizam a importância do controle de
256 *Salmonella* nos produtos avícolas e sugerem a necessidade de uso responsável dos
257 antimicrobianos visando manter a biossegurança.

258

259

AGRADECIMENTOS

260

261 Os autores agradecem ao Dr. Alberto Bach pela doação das amostras de *Salmonella*, ao
262 Instituto Adolfo Lutz pela sorotipagem da *Salmonella*, ao Conselho Nacional de
263 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento a F.G.S.P (Proc.
264 471164/2010) e a L.F.A.A. pela bolsa de produtividade, bem como, a Coordenação de
265 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pós-graduação de
266 E.A.M.B. e financiamento da pesquisa.

267

268

REFERÊNCIAS

269

270 ALALI, W.Q.; THAKUR, S.; BERGHAUS, R. D. et al. Prevalence and distribution of
271 *Salmonella* in organic and conventional broiler poultry farms. *Foodborne pathog. Dis.*, v.7,
272 p.1363-71, 2010.

273 ANDREATTI-FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; MENCONI, A. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp.
274 em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. *Vet. e Zootec.*, v.16, p.190-194, 2009.

275 ANTUNES, P.; REU, C.; SOUSA, J.C. et al. Incidence of *Salmonella* from poultry products
276 and their susceptibility to antimicrobial agents. *Inter. J. Food Microbiol.*, v.82, p.97-103,
277 2003.

278 BAUER-GARLAND, J.; FRYE, J.G.; GRAY, J.T. et al. Transmission of *Salmonella enterica*
279 serotype Typhimurium in poultry with or without antimicrobial selective pressure. *J. Appl*
280 *Microbiol.* v.101, p.1301-1308, 2006.

281 BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, v.26, p.523-530,
282 2003.

283 BOERLIN, P.; REID-SMITH, R.J. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission.
284 *Anim. Health Res. Rev.*, v.9, p.115–126, 2008.

285 BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de
286 Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise Epidemiológica de Surtos de Doenças
287 Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2008. Disponível em:
288 <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>>. Acessado em: 22 set. 2011.

289 CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R. et al. Antibiotic resistance in *Salmonella*
290 Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Braz. J. Microbiol.*, v.37, p.368-371, 2006.

- 291 CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I. et al. High prevalence of multiple
292 resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in
293 Spain. *Vet. Microbiol.*, v.104, p.133-139, 2004.
- 294 CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial
295 Susceptibility Testing: Seventh Informational Supplement M100-S17. 2007.
- 296 FREDERICK, A.; HUDA, N. Salmonellas, Poultry House Environments and Feeds: A
297 Review. *J. Anim. Vet. Adv.*, v.10, p.679-685, 2011.
- 298 HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K. et al. Beta-Lactamases among extended-
299 spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and
300 human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.56, p.115-21, 2005.
- 301 HOFER, E.; SILVA FILHO S.J.; REIS, E.M.F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matéria-
302 prima e de ração para aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.18, p.21-27, 1998. KANASHIRO,
303 A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; CARDOSO, A.L.S.P. et al. Serovars of *Salmonella* spp. isolated
304 from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to
305 December 2004. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.7, p.195-198, 2005.
- 306 KOTTWITZ, L.B.M.; BACK, A.; LEÃO, J.A. et al. Contaminação por *Salmonella* spp. em
307 uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arq. Bras. Med.*
308 *Vet. Zootec.*, v.60, p.496-498, 2008.
- 309 LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; PINTO, J.P.A.N. Perfil de susceptibilidade
310 antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* isolados de produtos avícolas. *Vet. Zoot.*, v.16,
311 p.394-400, 2009.
- 312 OKOLI, I.C.; NDUJIHE, G.E.; OGBUEWU, I.P. Frequency of isolation of *Salmonella* from
313 commercial poultry feeds and their anti-microbial resistance profiles, Imo State, Nigeria.
314 *Online J. Health Allied Scs.*, v.5, p.1-10, 2006.
- 315 OLIVEIRA, W.F.; CARDOSO, W.M.; SALLES, R.P.R. et al. Initial identification and
316 sensitivity to antimicrobial agents of *Salmonella* sp. isolated from poultry products in the state
317 of Ceara, Brazil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.8, p.193-199, 2006.
- 318 PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C; LIMA, S.I. et al. Surtos de enfermidades transmitidas
319 por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev. Saúde Públ.*, v.32, p.477-83, 1998.
- 320 RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R. et al. Resistência antimicrobiana em
321 *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arq. Inst.*
322 *Biol.*, v.73, p.357-360, 2006.

- 323 RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R. *Salmonella* spp. in Raw Broiler Parts:
324 Occurrence, Antimicrobial Resistance Profile and Phage Typing of the *Salmonella* Enteritidis
325 Isolates. *Braz. J. Microbiol.*, v.38, 296-299, 2007.
- 326 RUZAUSKAS, M.; VIRGAILIS, M.; ŠPAKAUSKAS, V. Serological diversity and
327 antimicro-bial resistance of *Salmonella* isolated from different sources in Lithuania.
328 *Veterinarski Arhiv.*, v.75, p.211–221, 2005.
- 329 SAKARIDIS, I.; SOULTOS, N.; IOSSIFIDOU, E. et al. Prevalence and Antimicrobial
330 Resistance of *Salmonella* Serovars From Chicken Carcasses in Northern Greece. *J. Food*
331 *Safety.*, v.31, p.203-210, 2011.
- 332 SILVA, E. M.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Rev.*
333 *Bras. Cienc. Avic.*, v.4, p.85-100, 2002.
- 334 SILVA, J.M.B.; HOLLENBACH, C.B. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina
335 veterinária. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, p.363-369, 2010.
- 336 SINDIAVIPAR. Sindicato e Associação dos Abatedouros e Produtores Avícolas do Paraná.
337 Avicultura do Paraná, 2011. Disponível em: <[http://painel.ubis.com.br/
338 clientes/sindiavipar/pdfs/24_edicao.pdf](http://painel.ubis.com.br/clientes/sindiavipar/pdfs/24_edicao.pdf)>. Acessado em: 22 nov. 2011.
- 339 SOUZA, R.B.; MAGNANI, M.; FERRARI, R.G. et al. Detection of quinolone-resistance
340 mutations in *Salmonella* spp. strains of epidemic and poultry origin. *Braz. J. Microbiol.*, v.42,
341 p.211-215, 2011.
- 342 SU, L.H.; CHIU, C.H. *Salmonella* nomenclature. *Chang Gung Med J.*, v.30, p.210-219, 2007.
- 343 UBABEF. União Brasileira de avicultura. Relatório Anual 2010/2011, 2011. Disponível em:
344 <http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php>. Acessado em: 22 nov.
345 2011.
- 346 VAZ, C.S.L.; STRECK, A.F.; MICHAEL, G.B. et al. Antimicrobial resistance and subtyping
347 of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks
348 and poultry in southern Brazil. *Poult Sci.*, v.89, p.1530-1536, 2010.
- 349
- 350
- 351
- 352
- 353
- 354
- 355
- 356

357 **4. Capítulo 2: Comparação de Métodos para determinação da Atividade**
358 **Antimicrobiana de Extratos Vegetais aquosos e etanólicos**

359

360

Revista Arquivos do Instituto Biológico

361 **COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE**362 **ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS AQUOSOS E ETANÓLICOS**

363

364 **E.A.M. De Bona¹, F.G.S. Pinto¹, T.K. Fruet¹, L.F.A.Alves¹ T.C.M. Jorg²; A.C. Moura³**

365

366 ¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de
367 Biotecnologia, Rua Universitária nº 2069, Caixa Postal 701, Jardim Universitário, CEP 85819-110, Cascavel,
368 PR, Brasil. E-mail: fabianagsp@yahoo.com.br

369

370

371

RESUMO

372 A ausência de padronização de métodos utilizados para a avaliação de extratos
373 vegetais com potencial antimicrobiano dificulta a comparação de resultados. Considerando
374 que alguns pesquisadores têm relatado a necessidade de estabelecer um método com
375 resultados consistentes para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais, este
376 trabalho propôs-se a avaliar a atividade antimicrobiana de plantas da família Myrtaceae sobre
377 diferentes micro-organismos utilizando de forma comparativa três métodos comumente
378 utilizados para avaliação de antimicrobianos. Os métodos empregados foram microdiluição
379 em caldo e de difusão em ágar por disco e poço. Foram avaliados os extratos de *Psidium*
380 *guajava* L., *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg e *Syzygium cumini* L. sobre bactérias Gram

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Farmacognosia, Cascavel, Paraná

³ Universidade Federal da Fronteira Sul, Laboratório de Microbiologia, Campus Realeza, Paraná

381 positivas, negativas e levedura. Em geral, a inibição promovida pelos extratos no teste de
382 difusão em ágar por poço foi maior do que os valores obtidos por disco, independentemente
383 do extrato vegetal testado. Contudo, a atividade inibitória de todos os micro-organismos só foi
384 possível ser determinada com o método de microdiluição em caldo, que também apresentou
385 os resultados mais reprodutíveis e, mostrou-se o mais econômico e confiável para se avaliar a
386 atividade antimicrobiana de extratos vegetais quando comparado aos outros métodos.

387

388 PALAVRAS-CHAVE: Myrtaceae, difusão em ágar, disco difusão, microdiluição

389

390 **METHOD-COMPARISON ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF**
391 **ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WATER AND ETHANOL PLANT EXTRACTS**

392

ABSTRACT

393 The lack of standardization of methods for the evaluation of plant extracts with
394 antimicrobial potential hinders result comparisons. Taking into consideration that some
395 researchers have reported the need to establish a method with consistent results to evaluate the
396 antimicrobial activity of plant extracts, this study aimed at evaluating the antimicrobial
397 activity of plants of the Myrtaceae family on different micro-organisms employing in a
398 comparative way three methods commonly used for the evaluation of antimicrobials. The
399 methods used were broth microdilution, and agar diffusion by disc and well. The evaluated
400 extracts were those of *Psidium guajava* L., *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg and
401 *Syzygium cumini* L. for Gram positive, negative, and yeast. In general, inhibition extracts
402 promoted by the agar diffusion test by well was higher than the values obtained by the disc,
403 regardless of plant extracts tested. However, the inhibitory activity of all micro-organisms
404 was only possible to be determined with the microdilution broth methods, which also
405 presented the more reproducible results, and proved to be the most economical and reliable
406 way to evaluate the antimicrobial activity of plant extracts in contrast to other methods.

407

408 KEY WORDS: Myrtaceae, agar diffusion, disc diffusion, microdilution

409

410 INTRODUÇÃO

411

412 Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados na descoberta de novos
413 agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o
414 objetivo de descobrir compostos com atividade comparada aos tradicionalmente utilizados,
415 porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos
416 patogênicos e com menor impacto ambiental.

417 Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos diferentes métodos
418 podem ser utilizados, sendo os mais conhecidos: método de difusão em ágar por poço, disco
419 difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição que são realizados em caldo. Os métodos
420 de difusão em ágar ou em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a
421 atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano
422 (CLSI, 2003). Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI) ou da Concentração
423 Bactericida Mínima (CBM) de extratos vegetais tem-se utilizado mais frequentemente o
424 método de microdiluição em caldo (OSTROSKY *et al.*, 2008).

425 O método de disco difusão foi proposto por vários autores para verificar a atividade
426 antimicrobiana de extratos vegetais, como por exemplo, NASCIMENTO *et al.*, (2000) e
427 KARAMAN *et al.*, (2003). Já, OSTROSKY *et al.* (2008) mencionam o método de microdiluição
428 em caldo como mais confiável para avaliar agentes antimicrobianos, por fornecer resultados
429 quantitativos e não ser influenciado pela velocidade de crescimento do micro-organismo. Por
430 outro lado, OTHMAN *et al.* (2011) propõem que, tanto o uso em base caldo como em base ágar
431 é necessário para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas para obtenção de
432 resultados confiáveis.

433 Embora geralmente sejam utilizadas as normatizações internacionalmente conhecidas
434 do CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) como base para testes de

435 suscetibilidade antimicrobiana, as diretrizes são direcionadas para antimicrobianos com
436 parâmetros já conhecidos, havendo poucos estudos comparativos, relatando qual o melhor
437 método a ser utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, mesmo
438 no que se refere às metodologias usualmente utilizadas. Além disso, há a necessidade da
439 uniformização dos métodos de extração e testes *in vitro*, para que a pesquisa possa ser mais
440 eficiente e a interpretação dos resultados mais facilitada e confiável (COWAN, 1999).

441 A ausência de padronização de metodologias limita as pesquisas sobre atividade
442 antimicrobiana de extratos vegetais no que tange a comparação de resultados obtidos por
443 diferentes pesquisadores ao avaliarem a mesma amostra com diferentes metodologias, e está
444 relacionada a um caráter multifatorial que pode modificar a inibição *in vitro* de crescimento
445 de micro-organismos, como o método de obtenção dos extratos, a espécie de micro-organismo
446 utilizado, a concentração da amostra e do inóculo e o método para a avaliação da atividade
447 antimicrobiana empregado (RIOS *et al.*, 1988; KING *et al.*, 2008).

448 Em relação à atividade antibacteriana de extratos de plantas, estudos prévios
449 comprovaram a eficácia de extratos de espécies da família Myrtaceae, como o de *Psidium*
450 *guajava* L., com uso de diferentes solventes (etanol-água, metanol, acetona e N,N-
451 dimetilformamida) sobre o crescimento dos micro-organismos *Escherichia coli*,
452 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp, *Shigella* spp, *Klebsiella*
453 *pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium, *Candida* sp e *Aspergillus* sp pelo método de difusão
454 em ágar (CARVALHO *et al.*, 2002; CHAH *et al.*, 2006; NAIR; CHANDA, 2007).

455 Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi comparar os métodos
456 microdiluição em caldo e de difusão em ágar por poço e por disco para a avaliação da
457 atividade antimicrobiana de extratos de três espécies de Myrtaceae (*Psidium guajava* L.,
458 *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg e *Syzygium cumini* L.) sobre bactérias Gram-positivas,
459 Gram-negativas e levedura.

460 MATERIAL E MÉTODOS

461

462 **Plantas e extratos**

463

464 As folhas das plantas *P. guajava* (goiabeira - 6900), *M. cauliflora* (jabuticabeira -
465 6882) e *S. cumini* (jambolão - 6898) foram coletadas nas primeiras horas da manhã, nos
466 meses de janeiro e fevereiro, em propriedades rurais no município de Medianeira, PR. Foram
467 selecionadas baseadas em suas atividades inibitórias verificadas anteriormente e identificadas
468 no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP), Cascavel, PR, Brasil,
469 sendo uma exsicata de cada planta depositada no Herbário com o registro do exemplar
470 *voucher* apresentado adjacente ao nome popular.

471 As folhas das plantas coletadas foram secas a 40°C e trituradas em moinho de facas do
472 Tipo *Willye*, até obtenção de pó de granulometria inferior a 0,42 mm. Prepararam-se os
473 extratos com base na metodologia de SANTURIO *et al.* (2007) com modificações. Para
474 obtenção do extrato etanólico adicionou-se ao pó álcool etílico PA na proporção de 2:10 (p/v)
475 para maceração por 24 horas em shaker rotativo a 23°C. Realizou-se a concentração do
476 extrato em rota-evaporador a 40°C. O extrato obtido foi diluído com água destilada estéril
477 contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) para a proporção final de 200 mg.mL⁻¹ e
478 esterilizado por filtração em membrana filtrante com porosidade de 0,45mm. Para a obtenção
479 do extrato aquoso, a maceração foi realizada utilizando-se como solvente extrator a água
480 destilada estéril contendo 10% de DMSO, seguindo os mesmos padrões de proporção,
481 armazenamento e filtragem do extrato etanólico. Uma última filtração a vácuo foi realizada
482 utilizando uma membrana filtrante com porosidade de 0,45mm. Ambos os extratos foram
483 armazenadas em freezer a -18 °C.

484

485 **Padronização dos inóculos bacterianos**

486

487 As culturas de micro-organismos foram mantidas a 4°C em ágar nutriente (AN). As
488 amostras foram recuperadas em caldo Mueller-Hinton (MH) para bactérias e caldo Caseína
489 Soja (TSA) para levedura e incubadas sem agitação durante 24 h a 36°C, com exceção de *B.*
490 *subtilis* que foi incubado a 30°C. Posteriormente, os inóculos foram repicados em placas de
491 ágar Mueller Hinton (AMH) e (TSB) 24 h antes do teste. Foram preparadas suspensões de
492 cultura e diluída em solução salina 0,85% utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até obter
493 aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL⁻¹) para bactérias e $2,0$
494 $\times 10^6$ UFC/mL⁻¹ para levedura.

495

496 **Determinação da atividade antimicrobiana**

497

498 Os testes foram realizados com cepas padrão de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*
499 CCCD B005, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella*
500 *pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium ATCC 14028;
501 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os extratos
502 foram diluídos e avaliados nas concentrações que variaram de 100 a $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$.

503 Foram utilizados os métodos microdiluição em caldo, com base na metodologia de
504 SANTURIO *et al.* (2007) com modificações e as metodologias de difusão em ágar por poço e
505 por disco, realizadas conforme recomendações do CLSI (2009a). Utilizou-se como controle
506 positivo os antimicrobianos cloranfenicol, gentamicina e nistatina (CLSI, 2009b).

507

508 **Avaliação da atividade antimicrobiana por de difusão em ágar pelas metodologias de**

509 **disco e de poço**

510
511 Previamente à realização dos experimentos, as amostras bacterianas foram recuperadas
512 em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 36°C por 18h antes. Avaliou-se a suscetibilidade
513 antimicrobiana de acordo com o método de disco difusão de acordo com recomendações do
514 CLSI (2008) com adaptações. Para tal, discos de papel filtro medindo 6 mm de diâmetro estéril
515 receberam uma alíquota de 20 µL de cada extrato a ser testado aplicado com pinça estéril
516 sobre uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH) previamente inoculada com o
517 micro-organismo a ser testado. Para o teste de difusão em disco foram considerados com
518 atividade inibitória os halos com diâmetro \geq a 6mm.

519 O teste de difusão por poço diferencia-se pela perfuração das placas de Petri contendo
520 ágar MH em três orifícios de 6 mm de diâmetro com o auxílio de um molde formando os
521 poços. As placas foram inoculadas em sua superfície pelos micro-organismos com o uso de
522 um suabe e então, os poços foram preenchidos com 40 µL do extrato na concentração a ser
523 testada.

524 Os dados obtidos nas avaliações de difusão em ágar foram submetidos à análise de
525 variância (ANOVA), sendo as médias das medidas dos halos comparadas pelo teste Tukey,
526 ambos a 5% de significância, utilizando-se o programa SISVAR® (FERREIRA, 2007).

527
528 **Metodologia de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória**
529 **Mínima (CIM), da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e da Concentração**
530 **Bactericida Mínima (CBM)**

531
532 As amostras foram recuperadas em caldo BHI a 36°C por 18h antes do teste.
533 Distribuiu-se em placa de microtitulação de 96 poços, 150 µL de MH (concentração dupla)
534 para bactérias e caldo RPMI-1640 com glutamina, sem bicarbonato de sódio e com 2% de

535 glicose (concentração dupla) para *Candida albicans* em todos os poços. Adicionou-se a
536 primeira coluna 150 µL de extrato, homogeneizou-se e retirou-se 150 µL de cada poço da
537 coluna 1 para a coluna 2 e assim sucessivamente até a coluna 12, obtendo-se então, as
538 concentrações do extrato (100 – 0,04 mg.mL⁻¹). Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 15
539 µL do inóculo em cada poço da microplaca e incubou-se a 35°C por 24h. Decorrido este
540 intervalo de tempo, foi acrescido a cada um dos orifícios 20 µL de uma solução aquosa de
541 cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5% e as microplacas foram novamente incubadas a
542 36°C por mais 3 h.

543 A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em mg.mL⁻¹ capaz de
544 impedir o crescimento microbiano. Já a CFM/CBM foi determinada com base na metodologia
545 de SANTURIO *et al.* (2007). A partir dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível,
546 no teste da CIM anterior a adição de CTT, foi retirada uma alíquota de 10 µL e inoculada na
547 superfície do ágar MH. As placas foram incubadas a 36°C e após 24h foi definida a
548 CFM/CBM como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do
549 inóculo. Os ensaios de CIM e CFM/CBM foram realizados em triplicata.

550

551 RESULTADOS E DISCUSSÃO

552

553 **Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar pelas técnicas de disco e de** 554 **poço**

555

556 Os resultados obtidos com os extratos aquosos e etanólicos de goiabeira, jabuticabeira
557 e jambolão após a realização dos ensaios de difusão em ágar pelo método do poço
558 demonstraram que houve inibição de todas as bactérias, pela verificação da formação de halos
559 de inibição ao redor dos poços onde foram depositadas as soluções testadas. Pelo método de

560 disco, verificou-se a inibição da maioria das bactérias, exceto de *K. pneumoniae*. No entanto,
561 não foi verificada a inibição da levedura *C. albicans* por nenhum método de difusão em ágar
562 (Tab. 1).

563 Verificou-se a presença do halo de inibição nas concentrações dos extratos entre 50-
564 100 mg.mL⁻¹, e para a comparação das medidas dos halos entre as metodologias de difusão
565 por poço e por disco utilizou-se a média do diâmetro dos halos na concentração de 100
566 mg.mL⁻¹, em teste de Tukey (significância de 5%) (Tab. 1).

567 Houve diferença significativa em 57% das medidas dos halos de inibição entre as
568 metodologias testadas, observando melhor desempenho dos extratos com a utilização do
569 método de poço. No método de disco não houve formação de halos de inibição em 47% do
570 total de testes realizados (Tab. 1). A diferença entre os métodos ficou mais evidente quando
571 analisados os extratos frente a *S. Typhimurium* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva),
572 sendo observada diferença significativa entre as metodologias de disco e poço ($p < 0,05$).

573 Através dos resultados do teste de difusão em ágar pela metodologia de poço foi
574 possível verificar a presença de halos de inibição para todos os extratos frente a *K.*
575 *pneumoniae*. CHATTOPADHYAY *et al.* (1998) obtiveram resultado semelhante ao atual
576 trabalho utilizando a técnica de disco difusão para testar a atividade de extratos aquosos e
577 etanólicos de jambolão. Os autores atribuem a atividade inibitória do jambolão à presença de
578 polifenóis derivados do ácido gálico e elágico. Ambos os trabalhos demonstraram atividade
579 inibitória dos extratos, em concentrações variáveis, frente às bactérias Gram-positivas (*S.*
580 *aureus* e *B.subtilis*) e para a maioria das Gram-negativas (como *E.coli*, *S. Typhimurium* e *P.*
581 *aeruginosa*).

582 Houve diferença significativa entre os halos de inibição verificados na metodologia do
583 poço e do disco para extrato aquoso de jambolão e todos os demais extratos etanólicos.
584 Resultados semelhantes foram obtidos por NASCIMENTO *et al.* (2000), ao avaliarem a

585 atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *S. cumini* sobre cepas bacterianas de
586 referência (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *K. pneumonia*), pelo método de disco
587 difusão em concentrações entre 50 a 300 mg.mL⁻¹.

588 Em relação as diferentes atividades apresentadas pelos extratos, o extrato etanólico de
589 goiabeira, assim como os demais extratos etanólicos, apresentaram maiores halos de inibição
590 do crescimento microbiano no teste de poço quando comparados aos extratos aquosos (Tab.
591 1). A atividade inibitória de goiabeira pode ser atribuída aos fitoconstituintes da espécie que
592 possuem ação antimicrobiana como cumarinas, flavonóides como a guaijaverina e quercetina,
593 ao ácido psidiólico, triterpenos taninos e elagitaninos que promovem precipitação de proteínas
594 (MARTINS *et al.*, 2000).

595 Não foram encontradas publicações referentes à atividade antimicrobiana das folhas da
596 jabuticabeira com a utilização dos métodos de difusão em ágar frente a micro-organismos
597 referência. A atividade bacteriostática e bactericida da jabuticabeira, pode estar relacionada à
598 presença de compostos da classe do seu principal constituinte, os taninos (REYNERTSON *et al.*,
599 2006), substâncias que apresentam uma atividade antimicrobiana relevante atribuída à
600 propriedade destes em se complexar com proteínas podendo atuar na inativação de enzimas
601 (MARTINS *et al.*, 2000; MELLO; SANTOS, 2002).

602 O controle realizado com antimicrobianos comerciais comprovou que na metodologia
603 de poço houve uma melhor difusão dos antimicrobianos, que possibilitou a medição de halos
604 maiores do que no teste de disco. Isto provavelmente se explique pela metodologia do poço
605 propiciar maior facilidade de contato entre antimicrobianos e os micro-organismos testados
606 (ALVES *et al.*, 2008).

607

608 **Metodologia de microdiluição em caldo e determinação das CIM's e CFM/CBM's**

609

610 Em geral, a CIM variou entre 0,39-100 mg.mL⁻¹, sendo que para as bactérias Gram-
611 positivas a variação das CIM's foi entre 6,25-100 mg.mL⁻¹ e de 0,39-25 mg.mL⁻¹ para as
612 Gram-negativas, indicando estas como as bactérias mais suscetíveis. Já a CIM para a levedura
613 *C. albicans* variou de 6,25-12,5 mg.mL⁻¹ (Tab. 3).

614 Excetuando-se o extrato etanólico de *S. cumini*, todos os demais apresentaram
615 atividade bactericida somente para as Gram-negativas com CBM entre 0,39 e 50 mg.mL⁻¹
616 (Tab. 3). Estes resultados discordam de SANCHES *et al.* (2005) que verificaram os maiores
617 efeitos bactericidas dos extratos hidro-alcoólicos de *P. guajava* sobre as bactérias Gram-
618 positivas *S. aureus* e *B. subtilis*. Esses resultados discrepantes podem estar relacionados ao
619 uso de diferentes frações etanol-água do extrato, resultando na extração de moléculas capazes
620 de penetrar a membrana de bactérias Gram-negativas, mas não de Gram-positivas (DUFFY;
621 POWER, 2001).

622 Nenhum extrato apresentou atividade fungicida nos métodos de difusão em ágar ou de
623 microdiluição testados (Tab. 1 e 3). Entretanto, COSTA *et al.*, (2009) utilizaram o método de
624 microdiluição e observaram atividade antifúngica do extrato de *S. cumini* L. sobre cepas
625 clínicas de *C. albicans*. As divergências encontradas no presente estudo em relação às
626 pesquisas acerca da atividade antifúngica já publicadas com *S. cumini* podem ser devidas às
627 diversas formas de preparo e às diferenças na composição química da planta. Esta composição
628 é determinada por diferentes fatores como: local, condições de cultivo e época de colheita.

629 Não foi possível comparar os resultados obtidos pelo método de microdiluição em
630 caldo dos extratos de *M. cauliflora*, já que ainda não foram publicados trabalhos
631 demonstrando as CIM's deste extrato pelo mesmo método.

632 Em relação aos antimicrobianos comerciais utilizados como controles positivos, todos
633 foram capazes de inibir o crescimento microbiano em baixas concentrações (Tab. 2).

634

635 **Comparação dos métodos**

636

637 Os valores referentes às atividades inibitórias dos extratos aquosos, seja por difusão
638 em disco, em poço ou microdiluição, foram menores do que os obtidos para os extratos
639 etanólicos. Esse fato provavelmente está relacionado aos distintos metabólitos que podem ser
640 obtidos nas diferentes extrações aquosa e etanólica, podendo conferir maior atividade aos
641 extratos etanólicos quando comparados com os aquosos (COWAN, 1999; SANCHES *et al.*,
642 2005).

643 O método de microdiluição em caldo possibilitou a visualização da atividade inibitória
644 dos extratos em menores concentrações, o mesmo não ocorreu nos métodos de difusão em
645 ágar. Pode ser observado também que, ao contrário do método de microdiluição em caldo,
646 alguns extratos nem mesmo apresentaram atividade inibitória quando foram utilizados nos
647 testes de difusão. A ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que o
648 extrato seja inativo frente ao micro-organismo testado, mas sim que a difusão não foi
649 completa, especialmente para os compostos menos polares que se difundem mais lentamente
650 no meio de cultura (MORENO *et al.* 2006).

651 Resultados semelhantes foram descritos por ALVES *et al.* (2008), ao avaliar a atividade
652 antimicrobiana de extratos etanólico e diclorometânico de *Miconia rubiginosa*
653 (Melastomataceae) utilizando os métodos de difusão em ágar e em caldo frente às bactérias
654 Gram-positivas e negativas. Observaram que no teste de microdiluição em caldo, os extratos
655 apresentaram atividade antibacteriana em que as CIM's variaram entre 250 e >400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$,
656 superior ao teste de difusão em ágar ou disco, sendo verificadas as medidas dos halos somente
657 entre 100 e 300 mg.mL^{-1} . Segundo os autores isto pode estar relacionado com a dificuldade
658 de difusão do extrato no meio de cultura sólido, ou ainda, devido às características lipofílicas
659 de algumas amostras e/ou da natureza química das substâncias isoladas (RIOS *et al.*, 1988).

660 OTHMAN *et al.* (2011) avaliaram a atividade dos extratos de folhas de *Duabanga*
661 *grandiflora* e *Acalypha wilkesiana*, utilizando os mesmos ensaios em ágar do atual trabalho,
662 acrescentando para disco difusão o espalhamento em profundidade e ainda, ensaio
663 turbidimétrico em caldo. Os melhores resultados foram obtidos nos métodos turbidimétrico
664 que mede a contagem total de células bacterianas, que incluem células vivas, bem como as
665 células mortas, e com o teste de difusão em ágar por “pour plate”, o qual reflete a contagem
666 de bactérias viáveis, sendo mais pontual e preciso. Assim, os autores propuseram o uso de
667 ambos os ensaios em ágar e caldo para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de
668 plantas para se obter resultados confiáveis.

669 Verificou-se que os resultados da CIM e CFM/CBM obtidos nesse estudo refletem o
670 efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento celular dos micro-organismos em caldo, e a
671 confirmação da presença de células vivas com o uso do CTT ou a presença de células viáveis
672 em ágar, exclui a necessidade da utilização de outros testes em base ágar.

673 ZGODA e PORTER (2001) avaliaram extratos orgânicos das plantas *Lemma minor* L. e
674 *Ilex cornuta* Lindl. pela metodologia de microdiluição em caldo e afirmaram que esse método
675 se mostrou confiável para a triagem de produtos naturais contra bactérias e fungos, sendo que
676 permite realizar triagem antimicrobiana determinando a CIM em testes com um grande
677 número de extratos, utilizando uma escala de nanogramas a microgramas dos compostos a
678 serem testados.

679 Apesar dos testes em ágar serem os mais utilizados e apresentarem como vantagem a
680 simples avaliação dos resultados pela visualização do halo, possuem como desvantagem
681 consistirem em métodos muito trabalhosos, no que se refere à preparação das placas e do
682 inóculo bacteriano, e o uso do disco imerso no extrato deixa resíduo adjacente ao disco,
683 influenciando na medição dos halos e na concentração do próprio disco. Já o teste de
684 microdiluição, gera uma economia de espaço, meios de cultura e reagentes, possibilitando a

685 determinação quantitativa da CIM, sendo possível realizar várias repetições e diversas
686 diluições uniformes dos extratos em apenas uma placa por micro-organismo, aumentando a
687 confiabilidade dos testes.

688

689

690 CONCLUSÕES

691

692 Quando comparados os resultados da atividade antibacteriana dos extratos aquosos e
693 etanólicos utilizando-se o método de difusão em ágar observou-se que houve diferença
694 significativa entre as metodologias de difusão em ágar analisadas, sendo que o ensaio de
695 difusão em ágar pelo método do poço demonstrou melhor desempenho, já que houve inibição
696 da maioria das bactérias testadas. Embora essa tenha sido a melhor técnica de difusão
697 observada nesse estudo, pode-se considerar que o método de microdiluição em caldo foi a
698 melhor opção para se determinar a atividade antimicrobiana por fornecer dados quantitativos,
699 ser mais confiável e econômico para se determinar a atividade antimicrobiana dos extratos
700 vegetais.

701

702 **Agradecimentos** - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
703 (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento
704 Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

705

706 REFERÊNCIAS

707

- 708 ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILV A,
709 M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening
710 para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de
711 substâncias puras. *Química Nova*, Franca, v. 31, p. 1224-1229, 2008.
- 712 CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA,
713 K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade Antimicrobiana *in vitro* de Extratos
714 Hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram-Negativas. *Acta Farmacéutica*
715 *bonaerens*, Recife, v. 21 n. 4, p. 255-258, 2002.
- 716 CHAH, K.F.; EZE, C.A.; EMUELOSI, C.E.; ESIMONE, C.O. Antibacterial and wound
717 healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of*
718 *Ethnopharmacology*, Nsukka, v. 104, p. 164–167, 2006.
- 719 CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B.K.; VAIAD, L.K. Antibacterial activity of *Syzygium*
720 species. *Fitoterapia*, Milão, v. 69, n.4, p. 356-367, 1998.
- 721 COSTA, A.C.B.P.; PEREIRA, C.A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C.
722 Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium*
723 *cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida Glabrata* e *Candida*
724 *tropicalis*. *Revista de Odontologia da UNESP*, São Paulo, v. 38, n.2. p.111-116, 2009.
- 725 COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*,
726 Oxford, v. 12, p. 564-582, 1999.
- 727 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution
728 susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Norma aprovada 3ª ed. Wayne, PA,
729 CLSI document M31-A3, 2008.

- 730 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial
731 Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-
732 A10, 2009a.
- 733 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial
734 Susceptibility Test for Bactéria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition.
735 Wayne, CLSI document M07-A8, 2009b.
- 736 DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese
737 plants extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Dunboyne, v. 17, p. 527-529,
738 2005.
- 739 FERREIRA, D.F. 2007. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Disponível em:
740 Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/danielff/software.htm>. Acesso em: 18 nov. 2011.
- 741 LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M.
742 Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de Jambolão (*Syzygium cumini*
743 (L. skulls). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376, 2005.
- 744 MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas medicinais*. 3^a
745 Ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2000. p.220.
- 746 MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A.A. Antioxidant and
747 antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free*
748 *Radical Research*, Buenos Aires, v.40, p.223–231, 2006.
- 749 NAIR, R.; CHANDA, S. In-vitro antimicrobial activity of *Psidium Guajava* L. leaf extracts
750 against clinically important pathogenic microbial strains. *Brazilian Journal of Microbiology*,
751 São Paulo, v.38, p.452-458, 2007.

- 752 NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial
753 activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian*
754 *Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n.4, p.247-56, 2000.
- 755 NCUBE, N.S.; AFOLAYAN, A.J.; OKOH, A.I. Assessment techniques of antimicrobial
756 properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African*
757 *Journal of Biotechnology*, Alice, v. 7, n.12, p. 1797-1806, 2008.
- 758 OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANECO, T.M.; NISHIKAWA,
759 S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação
760 da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de*
761 *Farmacognosia*, São Paulo, v.18, n.2, 2008.
- 762 OTHMAN, M.; LOH, H.S.; WIART, C.; KHOO, T.J.; LIM, K.H.; TING, K.N. Optimal
763 methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of*
764 *Microbiological Methods*, Selangor, v.84, p.161-166, 2011.
- 765 REYNERTSON, K. A. *Phytochemical analysis of bioactive components from edible*
766 *Myrtaceae fruits*. New York, 2007. Dissertação PhD, The City University of New York-
767 E.U.A, 2007. Disponível em: [http://www.home.earthlink.net/~phytochemistry/
768 archive/Reynertson_dissertation_final_11_15_2006.pdf](http://www.home.earthlink.net/~phytochemistry/archive/Reynertson_dissertation_final_11_15_2006.pdf)> Acessado em: 5 jun. 2010.
- 769 RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAW, A. Screening methods for natural products with
770 antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, Burjassot,
771 v.2, p.127- 149, 1988.
- 772 SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; SCHIAVINI, M.S.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-
773 FILHO, B.P. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). *Brazilian*
774 *Archives of Biology and Technology*, Maringá, v.48, n.3, p.429-36, 2005.

- 775 SANTURIO, M.J.; SANTURIO, D.F.; POZZATI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.;
- 776 ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela
- 777 frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. *Ciência Rural*, Santa Maria, ano 37, n.3,
- 778 p.803-808, 2007.
- 779 ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural
- 780 Products Against Bacteria and Fungi. *Pharmaceutical Biology*, Philadelphia, v.39, n.3, p.221–
- 781 225, 2001.

Tabela 1 – Comparação entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelas metodologias de difusão por disco e poço utilizando extratos aquosos e etanólicos de folhas de jambolão (*Syzygium cumini*), jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e goiabeira (*Psidium guajava*) frente a microorganismos padrão

Microorganismos	Jambolão						Jabuticabeira						Goiabeira					
	Aquoso		Etanólico		Aquoso		Etanólico		Aquoso		Etanólico		Aquoso		Etanólico			
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P		
Ca	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)					
Ec	9,3±2,3 a (cv = 24,7%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	9,3±0,5 a (cv = 61,0%)	8,3±4,0 a (cv = 48,4%)	0,0±0,0 a (cv = 11,1%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	12,0±1,7 a (cv = 14,4%)	13,6±1,1 a (cv = 8,4%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	9,0±1,0 b (cv = 11,1%)	15,0±1,0 a (cv = 6,6%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)		
Kp	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	9,0±3,6 a (cv = 40,0%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	15,6±1,9 a (cv = 12,0%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	19,0±4,0 a (cv = 21,0%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	10,0±3,4 a (cv = 34,6%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	14±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)		
Pa	12,3±2,3 a (cv = 18,7%)	10,6±8,0 a (cv = 75,7%)	10,3±2,0 b (cv = 20,1%)	22,3±6,0 a (cv = 26,9%)	7,6±1,1 a (cv = 17,3%)	10,6±8,0 a (cv = 75,7%)	13,0±1,7 a (cv = 13,3%)	18,6±6,3 a (cv = 34,0%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	12,6±1,1 a (cv = 9,10%)	9,6±1,5 b (cv = 15,8%)	16±1,7 a (cv = 10,8%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)		
ST	7,6±1,5 b (cv = 19,9%)	18,6±1,5 a (cv = 8,1%)	8,6±1,1 b (cv = 13,3%)	17,1±0,7 a (cv = 4,4%)	8,6±0,5 a (cv = 6,6%)	18,0±6,2 a (cv = 34,6%)	9,3±1,1 b (cv = 12,3%)	17,6±3,0 a (cv = 17,2%)	0,0±0,0 b (cv = 0,00%)	7,0±1,7 b (cv = 24,7%)	13,3±1,5 a (cv = 11,4%)	8,3±0,6 b (cv = 6,9%)	16,6±0,5 a (cv = 3,4%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)		
Sa	11,6±4,9 b (cv = 4,80%)	23,2±2,2 a (cv = 9,60%)	15±2,6 a (cv = 17,6%)	18,1±0,3 a (cv = 1,50%)	10,0±4 b (cv = 40,0%)	25±1,0 a (cv = 4,00%)	10,3±4 b (cv = 43,0%)	23,5±0,5 a (cv = 21,0%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)		
Bs	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	20,0±3,0 a (cv = 15,0%)	13,5±1,3 b (cv = 2,80%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	11,5±1,5 a (cv = 13,0%)	16,3±3,0 a (cv = 18,7%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	12,5±3,5 a (cv = 28,0%)	13,6±0,6 a (cv = 4,2%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)	0,0±0,0 a (cv = 0,00%)		

D= disco; P= poço; cv = coeficiente de variação; Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$); (0) não apresentou inibição; (-) = teste não aplicável; Ca=*Candida albicans* ATCC 10231, Ec=*Escherichia coli* ATCC 2592, Kp=*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, Pa=*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ST= *Salmonella enterica* subsp *enterica* Typhimurium 14028, Sa=*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Bs=*Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* CCCD B005.

Tabela 2 – Comparação entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelas metodologias de difusão por disco e poço utilizando antimicrobianos comerciais (nistatina, cloranfenicol e gentamicina) frente a micro-organismos padrão

Micro-organismos	Nistatina		Cloranfenicol		Gentamicina	
	Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	41,6± 1,5 a (cv = 3,6%)	43,3± 1,0 a (cv = 2,2%)	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	–	–	27,0± 2,0 b (cv = 7,4%)	51,0± 3,6 a (cv = 7,0%)	–	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	–	–	36,0± 1,0 b (cv = 1,1%)	44,0± 1,0 a (cv = 2,2%)	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–	–	36± 4,3 b (cv = 12,1%)	45± 0,0 a (cv = 0,00%)
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> Typhimurium 14028	–	–	28,3± 3,2 b (cv = 11,3%)	40,8± 1,6 a (cv = 3,9%)	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–	–	–	–	28,0± 2,6 b (cv = 9,4%)	34,3± 0,5 a (cv = 1,17%)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>spizizenii</i> CCCD B005	–	–	–	–	36,6± 2,0 b (cv = 5,6%)	47,6± 2,3 a (cv = 4,8%)

cv = coeficiente de variação; Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$); (0) não apresentou inibição; (-) = teste não aplicável.

787

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima, Concentração Funcida/Bactericida Mínima (mg/mL^{-1}) dos extratos de *Myrciaria cauliflora*, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini* e antimicrobianos comerciais frente a micro-organismos padrão

Extratos	<i>Candida albicans</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Salmonella Typhimurium</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		
	CIM	CFM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Etanólico	6,25	ND	0,39	0,39	0,78	3,13	0,39	0,39	0,39	0,78	12,5	ND	6,25	ND
	Aquoso	12,5	ND	3,13	3,13	6,25	25	3,13	3,13	3,13	6,25	25	ND	75	ND
<i>Psidium guajava</i>	Etanólico	12,5	ND	1,56	1,56	1,56	6,25	1,56	1,56	1,56	1,56	12,5	ND	6,25	ND
	Aquoso	12,5	ND	3,13	6,25	25	50	6,25	6,25	6,25	12,5	50	ND	100	ND
<i>Syzygium cumini</i>	Etanólico	6,25	ND	0,78	0,78	3,13	6,25	0,78	3,13	0,78	6,25	12,5	100	6,25	ND
	Aquoso	6,25	ND	3,13	3,13	3,13	6,25	1,56	1,56	1,56	3,13	25	ND	100	ND
Cloranfenicol	-	-	0,04	0,04	0,04	0,04	-	-	0,04	0,04	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	0,04	0,09	-	-	0,04	0,09	0,04	0,04	0,04
Nistatina	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ND= não determinado na faixa de concentração testada; (-)= teste não aplicável

1 **5. Capítulo 3: Potencial Antimicrobiano de Extratos de Plantas Nativas Brasileiras**
2 **sobre Sorovares de *Salmonella* de Origem Aviária**

3
4 **Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

5
6 **Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

7
8 **Potencial antimicrobiano de extratos de plantas nativas brasileiras sobre sorovares de**
9 ***Salmonella* de origem aviária**

10 **[*Antimicrobial potential of Brazilian native plant extracts upon avian-origin Salmonella***
11 ***serovars*]**

12
13 RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana
14 dos extratos de seis plantas nativas brasileiras frente à sorovares de *Salmonella* spp. de
15 origem aviária isolados entre 2006 a 2010 na região Oeste do Paraná. Os ensaios foram
16 realizados pelo método de microdiluição em caldo determinando-se a Concentração
17 Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos
18 aquosos e etanólicos das plantas *Maytenus aquifolium*, *Myrciaria cauliflora*, *Ocotea*
19 *spixiana*, *Psidium guajava*, *Ricinus communis* e *Schinus molle*. Os resultados
20 demonstraram que todas as plantas apresentaram atividade inibitória sobre *Salmonella*
21 spp., sendo os extratos etanólicos mais efetivos quando comparados aos extratos aquosos.
22 Os extratos etanólicos de *M. cauliflora* (Mart.) O. Berg e *P.guajava* L., apresentaram as
23 maiores atividades inibitórias. As CIMs variaram entre 1,56-100 mg.mL⁻¹ e a CBM entre
24 3,13-100 mg.mL⁻¹. A suscetibilidade aos extratos variou entre os sorovares de *Salmonella*,
25 independente da resistência aos antimicrobianos testados.

26 PALAVRAS-CHAVE: antimicrobiano alternativo, *Salmonella* spp., concentração
27 inibitória mínima, extratos vegetais.

28
29 *ABSTRACT: The purpose of this study was to evaluate in vitro the antimicrobial activity of*
30 *extracts of six Brazilian native plants acting upon avian-origin Salmonella spp. serovars,*

31 *isolated between 2006 to 2010 in western Paraná. Assays were performed by the*
32 *microdilution broth method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*
33 *and minimum bactericidal concentration (MBC) of water and ethanol extracts of the plants*
34 *Maytenus aquifolium, Myrciaria cauliflora, Ocotea spixiana, Psidium guajava, Ricinus*
35 *communis and Schinus molle. The results showed that all plants had inhibitory activity*
36 *against Salmonella spp., being the ethanol extracts more effective when compared to*
37 *aqueous extracts. The ethanol extracts of M. cauliflora (Mart.) O. Berg and P.guajava*
38 *showed the highest inhibitory activities. The MICs ranged from 1.56-100 mg.mL⁻¹ and*
39 *CBM¹ from 3.13-100 mg.mL⁻¹. The susceptibility to the extracts varied among Salmonella*
40 *serovars, regardless of resistance to antimicrobials.*

41

42 *KEYWORDS: alternative antimicrobial, Salmonella spp., minimum inhibitory*
43 *concentration, plant extracts.*

44

45 **INTRODUÇÃO**

46

47 A bactéria *Salmonella* é um patógeno comumente encontrado em toda a cadeia de
48 produção avícola e conseqüentemente, na carne de frango, podendo causar surtos de
49 intoxicação alimentar em humanos e prejuízos econômicos à indústria avícola. É
50 considerado de difícil controle, por apresentar como reservatório natural o trato
51 gastrointestinal de animais e apresentando ocorrência de sorovares com variações regionais
52 (Shinohara *et al.*, 2008).

53

54 Com o intuito de controlar e prevenir a contaminação por patógenos, o uso
55 intensivo e a aplicação inadequada de antimicrobianos conduziu a seleção de *Salmonella*
56 spp. resistentes a antimicrobianos, bem como, a presença de resíduos destes na carne e
derivados que podem causar problemas ambientais e à saúde humana (Fuller, 1989).

57 Desde 2002, Castro et al. vem chamando atenção para a necessidade de a
58 investigação de novos compostos antimicrobianos naturais, de baixo impacto ambiental,
59 ser intensificada no intuito de controlar a ação de micro-organismos patogênicos.

60 Os extratos vegetais vêm ganhando espaço nas pesquisas sobre inibição de
61 diferentes micro-organismos patogênicos (Nascimento *et al.*, 2000; Loguercio *et al.*, 2005;
62 Ushimaru *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009). Novas plantas estão
63 sendo estudadas a fim de que os extratos sejam considerados como um produto sanitário
64 alternativo, seguro e saudável quando comparado aos antimicrobianos sintéticos (Duarte,
65 2004). Nesse aspecto, destaca-se o Brasil por apresentar a maior biodiversidade do planeta,
66 e consequentemente grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos de
67 origem vegetal. Além disso, muitas plantas já vêm sendo vastamente utilizadas e testadas
68 há dezenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro
69 (Ferronato *et al.* 2007).

70 Como exemplo, Wiest *et al.* (2009) determinaram *in vitro* a intensidade de
71 atividade de inibição e inativação bacteriana de diferentes extratos, aquosos ou
72 alcoólicos/hidroalcoólicos, de 86 plantas com indicativo etnográfico medicinal ou
73 condimentar sobre *Salmonella* spp. e verificaram que, 50 plantas apresentaram alguma
74 atividade seletiva antissalmonela.

75 Contudo, grande parte das pesquisas realizadas mencionam testes de extratos frente
76 aos micro-organismos referência, sendo necessário o estabelecimento de parâmetros mais
77 precisos quanto ao real potencial antimicrobiano de extratos em diferentes sorovares de
78 *Salmonella*, uma vez que tem sido relatado diversos sorovares responsáveis por casos e
79 surtos de salmonelose humana no Brasil e no exterior, muitos deles envolvendo alimentos
80 de origem avícola. (Gonçalves *et al.* 2005, Kottwitz *et al.* 2008).

81 Considerando que são raros ou inexistentes os relatos científicos sobre o
82 comportamento dos extratos etanólicos e aquosos de plantas sobre diferentes sorovares de
83 *Salmonella*, e ainda, a importância econômica, agroambiental e de saúde pública que
84 envolve a contaminação de aves por este patógeno, nesta pesquisa objetivou-se avaliar a
85 atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos das folhas de diferentes espécies
86 vegetais nativas sobre 36 diferentes sorovares de *Salmonella* spp. de origem aviária.

87

88

89 **MATERIAL E MÉTODOS**

90

91 Foram isoladas 118 amostras de *Salmonella* provenientes de fezes (suabe de cloaca),
92 cama (suabe de arrasto) e rações (farinhas/insumos de rações) de frango de corte entre
93 2006 e 2010, provenientes de diferentes aviários da região Oeste do Paraná, Brasil,
94 fornecidas pelo Laboratório Veterinário MercoLab, Cascavel, PR, Brasil, sendo sua
95 caracterização antigênica completa e identificação de sorovar realizadas pelo Instituto
96 Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. As amostras corresponderam a 36 diferentes sorovares de
97 *Salmonella* e um representante de cada sorovar foi selecionado para avaliar a
98 suscetibilidade a antimicrobianos comerciais e aos extratos vegetais. Utilizou-se como
99 cepa referência, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (American Type Culture
100 Collection).

101 O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão
102 em ágar (CLSI M100-S17; 2007, utilizando-se os seguintes antibióticos: ácido nalidíxico
103 (30 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), cefalotina (30 µg), ciprofloxacina (5
104 µg), enrofloxacina (10 µg), estreptomicina (10 µg), imipenem (10 µg), gentamicina (10
105 µg), norfloxacina (10 µg), sulfazotrin (25 µg), tetraciclina (30 µg) e tobramicina (10 µg).

106 As plantas de *Maytenus aquifolium* Mart. (espinheira-santa), *Myrciaria cauliflora*
107 (Mart.) O. Berg (jabuticabeira), *Ocotea spixiana* (Nees) Mez. (canela-branca), *Psidium*
108 *guajava* L. (goiabeira), e *Ricinus communis* L. (mamona) e *Schinus molle* L. (aroeira-
109 branca) foram coletadas em diferentes localidades na região oeste do Paraná, sendo
110 selecionadas baseando-se em suas atividades inibitórias reportadas anteriormente (Sanches
111 *et al.*, 2005; Fenner *et al.*, 2006; Caffarini *et al.*, 2008; Lorenzi e Matos, 2008; Macedo-
112 Costa *et al.*, 2009; Santos-Oliveira *et al.*, 2009). Todas as plantas foram identificadas e
113 incorporadas no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP).

114 As folhas das plantas coletadas foram secadas a 40°C e moídas em moinho de facas
115 até granulometria inferior a 0,42 mm. O pó obtido foi armazenado em recipientes de vidro
116 hermeticamente fechados, protegidos da luz, até seu uso na elaboração dos extratos. Para a
117 obtenção do extrato etanólico, adicionou-se ao pó álcool etílico P.A. na proporção de 2:10
118 (p/v) para maceração por 24 h em agitador rotativo a 23°C. A concentração do extrato

119 realizou-se em rota-evaporador a 40°C. O extrato obtido foi diluído com água destilada
120 estéril na proporção de 200 mg.mL⁻¹ e filtrado. Para a obtenção do extrato aquoso, a
121 maceração foi realizada utilizando-se como solvente extrator a água destilada estéril,
122 seguindo o mesmo padrão de proporção, armazenamento e filtragem do extrato etanólico.
123 Uma última filtração a vácuo foi realizada, utilizando uma membrana filtrante com
124 porosidade de 0,45mm. Ambas as soluções foram armazenadas em freezer entre -18°C e -
125 20°C.

126 A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi determinada pela técnica
127 da microdiluição em caldo com base na metodologia descrita no documento M100-S17 do
128 CLSI (2007), com modificações. As amostras foram crescidas em caldo Brain Heart
129 Infusion (BHI-HIMEDIA) a 36°C/18 h. Foram preparadas suspensões destas culturas em
130 solução salina 0,85% até obter turbidez correspondente a 0,5 na escala McFarland (1,5.10⁸
131 UFC.mL⁻¹). Distribuiu-se em placas de microtitulação de 96 poços, 150 µL de caldo
132 Mueller Hinton (MH -HIMEDIA) (2x), 150 µL de extrato (em diluições seriadas entre 100
133 e 0,04 mg. mL⁻¹ a cada linha) e por fim, adicionou-se uma alíquota de 15 µL do inóculo e
134 incubou-se a 36°C/24 h em condições de aerobiose. Decorrido este intervalo de tempo, foi
135 acrescido em cada um dos poços 20 µL uma solução aquosa de cloreto de trifetil
136 tetrazolium (CTT) a 0,5% e as placas foram re-incubadas por 3h/36°C. A ausência de
137 coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória do extrato. A CIM foi
138 definida como a menor concentração do extrato em mg.mL⁻¹ capaz de impedir o
139 crescimento microbiano.

140 A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada com base na
141 metodologia de Santurio *et al.*, (2007). A partir dos poços onde não houve crescimento
142 bacteriano visível no teste da CIM, anterior a adição de CTT, foi retirada uma alíquota de
143 10 µL e inoculada, com auxílio de uma micropipeta, na superfície do ágar MH. As placas
144 foram incubadas a 36°C e após 24h foi definida a CBM como a menor concentração do
145 extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios de CIM e CBM foram
146 realizados em triplicata.

147

148 **RESULTADOS**

149

150 Os sorovares testados apresentaram variações na suscetibilidade frente aos
 151 diferentes extratos, conforme indicam os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM)
 152 e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos vegetais etanólicos e aquosos
 153 sobre sorovares de *Salmonella* isolados de granjas aviárias no Oeste do Paraná entre 2006 e
 154 2011 (Tab 1 e 2).

Tabela 1 – Perfil de resistência e concentração inibitória mínima (mg.mL⁻¹) de extratos vegetais etanólicos e aquosos sobre sorovares de *Salmonella* isolados de granjas aviárias no Oeste do Paraná entre 2006 e 2011.

SOROVARES	Perfil de resistência	Extratos etanólicos					Extratos aquosos				
		Mc	Sm	Rc	Pg	Os	Ma	Mc	Sm	Pg	Ma
Morehead	Sensível	3,13	50	12,5	6,25	25	12,5	12,5	100	50	50
Lexington	AMP-CEF	3,13	100	25	6,25	25	12,5	25	100	100	50
Give	Sensível	1,56	100	25	6,25	25	12,5	12,5	100	100	50
Panamá	Sensível	3,13	50	25	6,25	25	12,5	25	100	100	100
Typhimurium	GEN-NAL	1,56	100	25	6,25	25	12,5	25	100	100	50
Rissen	Sensível	3,13	100	50	6,25	25	12,5	25	100	100	50
Albany	Sensível	3,13	100	100	3,13	25	12,5	12,5	100	50	50
Gallinarum	Sensível	1,56	100	100	6,25	25	12,5	50	100	50	50
Cerro	Sensível	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	12,5	100	100	50
Infantis	GEN-NAL	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	25	100	100	100
Schwarzengrund	Sensível	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	25	100	100	100
Worthington	Sensível	3,13	100	12,5	3,13	25	12,5	25	100	100	100
Saintpaul	Sensível	3,13	100	12,5	3,13	25	12,5	25	100	100	100
Braenderup	Sensível	3,13	100	12,5	3,13	25	12,5	25	100	100	100
Montevideo	Sensível	3,13	100	12,5	3,13	25	12,5	12,5	100	100	100
Mbandaka	TET	3,13	100	12,5	3,13	25	12,5	25	100	100	50
Ohio	Sensível	1,56	100	25	3,13	25	12,5	25	100	100	100
Agona	Sensível	1,56	100	25	6,25	25	12,5	25	100	100	50
Senftenberg	Sensível	1,56	100	25	6,25	50	12,5	25	100	100	50
Corvallis	Sensível	1,56	100	25	3,13	25	6,25	12,5	100	100	100
Hadar	TET-NAL	1,56	100	50	3,13	25	12,5	25	100	100	50
Grumpensis	Sensível	1,56	100	25	3,13	25	12,5	12,5	100	100	50
Gafsa	Sensível	1,56	100	25	3,13	25	12,5	50	100	100	50
Orion	Sensível	1,56	100	25	3,13	25	12,5	50	100	100	50
Tennessee	Sensível	3,13	100	25	6,25	25	12,5	12,5	100	100	50
Cubana	TET	1,56	100	25	6,25	25	25	25	100	100	50
Kentucky	Sensível	1,56	100	12,5	6,25	25	25	12,5	100	100	50
Bareilly	Sensível	3,13	100	25	3,13	25	25	25	100	100	50
Livingstone	Sensível	3,13	100	25	6,25	25	25	25	100	100	50
Minnesota	NAL	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	12,5	100	100	50
Branderburg	Sensível	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	25	100	100	50
Enteritidis	Sensível	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	25	100	50	50
Newport	TET	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	25	100	100	50
Entérica	TET	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	25	100	50	100
Derby	TET	1,56	100	12,5	6,25	25	12,5	12,5	100	100	100
Heidelberg	Sensível	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	25	100	50	50

Typhimurium ATCC	Sensível	3,13	100	12,5	6,25	25	12,5	12,5	100	50	50
AMP= Ampicilina; CEF= Cefalotina; GEN= Gentamicina; NAL= Acido Nalidixico; TET=Tetraciclina; Mc=Myrciaria cauliflora; Sm= Schinus molle; Rc= Ricinus communis; Pg= Psidium guajava; Os = Ocotea spixiana; Ma= Maytenus aquifolium;											

155

156 Os extratos aquosos de *R. communis* e *O. spixiana* não apresentaram atividade
157 inibitória, portanto, não foram apresentados nas tabelas.

158 Em relação à resistência, 10 sorovares apresentaram-se resistentes aos
159 antimicrobianos: *S. Lexington* (AMP-CEF), *S. Typhimurium* e *S. Infantis* (GEN-NAL), *S.*
160 *Hadar* (TET-NAL), *S. Minnesota* (NAL), *S. Cubana*, *S. Mbandaka*, *S. Newport*, *S. Enterica*
161 e *S. Derby* (TET). Porém, não foi estabelecida uma relação entre o perfil de resistência
162 destes sorovares com a suscetibilidade aos extratos (Tab.1). Já quanto à sensibilidade dos
163 sorovares aos extratos, verificou-se diferentes respostas dependendo do extrato a ser testado,
164 não sendo possível identificar um padrão de sensibilidade homogêneo entre os sorovares.

165 A efetividade dos extratos etanólicos sobre os sorovares foi maior do que os
166 extratos aquosos (Tab. 1, 2 e 3). As maiores CIMs e CBMs obtidas frente aos sorovares de
167 *Salmonella* foram apresentadas pelo extrato etanólico de *M. cauliflora* que foi capaz de
168 inibir todos os sorovares com valores de CIM entre 1,56 e 3,13 mg.mL⁻¹ e CBM entre 3,13
169 e 6,25 mg.mL⁻¹. Já o extrato aquoso de *M. cauliflora* apresentou CIM e CBM entre 12,5 e
170 50 mg.mL⁻¹ promovendo a inibição dos sorovares *S. Kentucky*, *S. Corvallis*, *S. Cerro*, *S.*
171 *Albany* e *S. Morehead* a 12,5 mg. mL⁻¹ (Tab. 1 e 2).

172

Tabela 2 - Concentração bactericida mínima (mg.mL⁻¹) de extratos vegetais aquosos e etanólicos sobre sorovares de *Salmonella* isolados de granjas aviárias no Oeste do Paraná entre 2006 e 2010.

SOROVARES	CLO	Extratos etanólicos					Extratos aquosos	
		Mc	Rc	Pg	Os	Ma	Mc	Pg
Morehead	0,04	6,25	100	12,5	50	100	12,5	50
Lexington	0,04	6,25	ND	12,5	ND	100	25	ND
Give	0,04	6,25	ND	12,5	100	100	50	ND
Panamá	0,04	6,25	ND	12,5	100	100	50	ND
Typhimurium	0,04	3,13	ND	12,5	ND	100	25	ND
Rissen	0,04	6,25	ND	12,5	50	100	50	ND
Albany	0,09	6,25	100	3,13	50	100	12,5	50
Gallinarum	0,09	6,25	100	6,25	ND	100	50	100
Cerro	0,09	6,25	100	6,25	ND	100	12,5	100
Infantis	1,5	3,13	50	12,5	ND	100	25	ND
Schwarzengrund	0,09	6,25	100	6,25	ND	ND	25	ND

Worthington	0,09	6,25	100	12,5	ND	ND	50	100
Saintpaul	0,04	6,25	100	12,5	ND	100	25	100
Braenderup	0,09	6,25	100	12,5	ND	100	25	ND
Montevideo	0,04	6,25	100	12,5	ND	100	25	ND
Mbandaka	0,04	6,25	100	6,25	ND	ND	25	ND
Ohio	0,04	3,13	25	12,5	50	ND	25	100
Agona	0,09	3,13	25	12,5	50	ND	50	ND
Senftenberg	1,5	6,25	ND	12,5	100	ND	50	ND
Corvallis	0,09	3,13	ND	6,25	ND	12,5	12,5	100
Hadar	0,09	3,13	ND	6,25	ND	ND	25	ND
Grumpensis	0,09	3,13	ND	6,25	ND	ND	25	100
Gafsa	0,09	6,25	ND	12,5	ND	ND	50	100
Orion	0,09	3,13	ND	6,25	ND	ND	50	100
Tennessee	0,04	6,25	100	25	50	ND	25	ND
Cubana	0,04	3,13	ND	6,25	ND	ND	25	100
Kentucky	0,09	3,13	ND	12,5	50	ND	12,5	100
Bareilly	0,09	6,25	ND	12,5	50	ND	50	ND
Livingstone	0,04	6,25	ND	12,5	50	ND	25	ND
Minnesota	0,04	6,25	100	12,5	50	ND	25	ND
Branderburg	0,15	6,25	100	12,5	50	ND	50	100
Enteritidis	0,15	6,25	25	12,5	ND	ND	50	100
Newport	0,04	6,25	ND	12,5	ND	ND	25	100
Enterica	0,04	6,25	ND	12,5	50	ND	25	100
Derby	0,15	3,13	ND	12,5	50	ND	25	100
Heidelberg	0,15	3,13	ND	12,5	50	ND	25	100
Typhimurium ATCC	0,15	6,25	ND	12,5	100	ND	25	100

ND: Não determinado; Clo=cloranfenicol; Me= *Myrciaria cauliflora*; Sm= *Schinus molle*; Rc= *Ricinus communis*; Pg= *Psidium guajava*; Os= *Ocotea spixiana*; Ma= *Maytenus aquifolium*

173

174

175

176

177

O extrato etanólico de *R. communis* apresentou valores de CIM entre 12,5 e 25 mg.mL⁻¹ para a maioria dos sorovares exceto para *S. Rissen* que apresentou CIM de 50 mg.mL⁻¹ e *S. Albany* e *S. Gallinarum* de 100 mg.mL⁻¹(Tab. 1). O extrato aquoso não apresentou atividade inibitória para os sorovares testados (Tab. 2).

178

179

180

181

182

O extrato etanólico de *P. guajava* apresentou elevada inibição frente a todos os sorovares, sendo que apresentou CIM e CBM entre 3,13 e 12,5 mg.mL⁻¹ (Tab.1 e 2). No entanto, o extrato aquoso desta planta apresentou atividade inibitória somente nas concentrações mais elevadas (50-100 mg.mL⁻¹) e atividade bactericida frente a poucos sorovares (Tab. 2).

183

184

185

186

O extrato etanólico de *M. aquifolium* também apresentou elevada atividade inibitória frente a todos os sorovares de *Salmonella* diferentemente do aquoso, que não apresentou atividade bactericida. Um dado relevante foi o resultado do extrato etanólico frente ao sorovar *S. Corvallis*, pois, somente frente a esta bactéria a atividade

187 bacteriostática e bactericida foram verificadas na concentração de 6,25 mg.mL⁻¹,
 188 diferente de todos os outros sorovares, que foram inibidos em concentrações mais elevadas.

189 Apenas o extrato etanólico de *O. spixiana* apresentou atividade antimicrobiana com
 190 valores da CIM em 25 mg.mL⁻¹ para todos os sorovares, exceto para *S. Senftenberg*, que
 191 apresentou CIM de 50mg.mL⁻¹ e atividade bactericida somente para uma minoria dos
 192 sorovares em concentrações entre 25-100 mg.mL⁻¹.

193 Verificou-se o potencial inibidor decrescente dos extratos, sendo eles: *M. cauliflora*
 194 etanólico > *P. guajava* etanólico > *M. aquifolium* etanólico > *R. communis* etanólico > *M.*
 195 *cauliflora* aquoso > *O. spixiana* etanólico > *M. aquifolium* aquoso > *P. guajava* aquoso >
 196 *S. molle* etanólico > *S. molle* aquoso (Tab. 3).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana (mg.mL⁻¹) dos extratos de *Myrciaria cauliflora*, *Schinus molle*, *Ricinus communis*, *Psidium guajava*, *Ocotea spixiana* e *Maytenus aquifolium* frente a sorovares de *Salmonella* isolados de granjas aviárias no Oeste do Paraná entre 2006 e 2011.

	Extratos	Faixa	CIM			CBM			MG
			CIM ₅₀	CIM ₉₀	MG	Faixa	CBM ₅₀	CBM ₉₀	
Etanólicos	Mc	1,56-3,13	1,56	3,13	2,4	3,13-6,25	6,25	6,25	5,0
	Sm	50-100	100	100	96,3	100	100	ND	ND
	Rc	12,5-100	12,5	12,5	19,8	25-100	100	ND	ND
	Pg	3,13-6,25	6,25	6,25	4,8	6,25-25	12,5	12,5	10,4
	Os	25-50	25	25	25,5	50-100	100	ND	ND
	Ma	6,25-25	12,5	12,5	13,3	12-100	ND	ND	ND
Aquosos	Mc	12,5-50	25	25	21,1	12,5-50	25	50	28,5
	Sm	100	100	100	100,0	ND	ND	ND	ND
	Rc	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Pg	50-100	100	100	87,7	50-100	100	ND	ND
	Os	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ma	50-100	50	100	61,4	ND	ND	ND	ND

ND: Não determinado; CIM =Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM₅₀ = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% dos isolados; CIM₉₀ = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 90% dos isolados; CBM₅₀ = Concentração Bactericida Mínima para 50% dos isolados; CBM₉₀ = Concentração Bactericida Mínima para 90% dos isolados; MG = Média Geométrica; Mc= *Myrciaria cauliflora*; Sm= *Schinus molle*; Rc= *Ricinus communis*; Pg= *Psidium guajava*; Os= *Ocotea spixiana*; Ma= *Maytenus aquifolia*

197

198 As médias geométricas para as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e
 199 Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) frente aos sorovares de *Salmonella* avícola
 200 foram: Extratos etanólicos de *M. auliflora* (CIM=2,40 e CBM=5,26), *S. molle* (CIM=96,3,
 201 não apresentou atividade bactericida sobre os sorovares), *R. communi* (CIM=20, não
 202 apresentou atividade bactericida sobre todos sorovares), *P. guajava* (CIM=4,9 e
 203 CBM=10,51), *O. spixiana* (CIM=25,5 não apresentou atividade bactericida sobre todos

204 sorovares), *M. aquifolium* (CIM=13,22, não apresentou atividade bactericida sobre
205 todos sorovares) e extratos aquosos de *M. cauliflora* (CIM=21,12 e CBM=28,72), *S. molle*
206 (CIM=100, não apresentou atividade bactericida), *P. guajava* (CIM=87,71, não apresentou
207 atividade bactericida) e *M. aquifolium* (CIM=61,44, não apresentou atividade bactericida)
208 (Tab. 3).

209

210 **DISCUSSÃO**

211

212 De maneira geral, os extratos etanólicos apresentaram maior atividade inibitória
213 frente aos sorovares de *Salmonella* quando comparados aos extratos aquosos. Embora,
214 ambos os solventes água e etanol sejam solventes polares, a extração aquosa e etanólica
215 podem conferir a extração de diferentes metabólitos, sendo a água capaz de extrair
216 anticoninas, amidos, taninos, saponinas, terpenóides, polipeptídeos e lecitinas, já o álcool,
217 por sua vez, é responsável pela extração além de taninos e terpenóides também de
218 polifenóis, poliacetilenos, esteróis, alcalóides e os flavonóides (Cowan, 1999).

219 Embora o solvente etanólico tenha apresentado maior eficiência na extração de
220 metabólitos na inibição das *Salmonella* spp., do que o solvente aquoso, os testes com
221 extratos aquosos são importantes, visto que, a produção destes extratos poderá contribuir
222 para o estabelecimento de um processo de desenvolvimento agrícola economicamente
223 viável no controle de contaminação aviária em substituição dos compostos inorgânicos
224 convencionais.

225 A sensibilidade aos antimicrobianos e aos extratos testados variou dependente do
226 sorovar, conforme descrito anteriormente por Carraminana *et al.*, (2004), que testaram a
227 suscetibilidade de *Salmonella* spp., frente a diferentes antibióticos e relacionam essa
228 variação, também, a origem do sorovar.

229 A atividade bacteriostática e bactericida de *M. cauliflora*, pode estar relacionada à
230 presença de compostos da classe do seu principal constituinte, os taninos (Reynertson *et*
231 *al.*, 2006), substâncias que apresentam uma atividade antimicrobiana relevante atribuída à
232 propriedade destes em se complexar com proteínas, podendo atuar na inativação de
233 enzimas dos micro-organismos (Martins *et al.*, 2000; Mello e Santos, 2002).

234 A atividade inibitória de *R. communis* está relacionada aos seus constituintes
235 como ricina e rutina, que são antimicrobianos que atuam na inibição de atividade
236 enzimática dos micro-organismos e que, provavelmente, foram extraídos pelo solvente
237 etanol e não pela água (Martins *et al.*, 2000; Henriques *et al.*, 2002; Lorenzi e Matos
238 2008).

239 Não foram encontrados na literatura pesquisas sobre as propriedades
240 farmacológicas dos extratos aquosos ou etanólicos de *S. molle*. Porém, estudos atribuem ao
241 óleo essencial de *S. molle* a atividade repelente e anti-séptica, normalmente atribuída à
242 presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis, substâncias que, podem ter sido
243 extraídas por etanol e água no atual trabalho (Lorenzi e Matos, 2008).

244 A atividade inibitória de *P. guajava* pode ser atribuída aos fitoconstituintes da
245 espécie que possuem ação antimicrobiana como cumarinas, flavonóides como a
246 guaijaverina e quercetina, ao ácido psidiólico, triterpenos taninos e elagitaninos que
247 promovem precipitação de proteínas (Martins *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2006; Vargas-
248 Alvarez *et al.*, 2006).

249 Embora não tenham sido encontrados na literatura trabalhos que explorem a
250 atividade de *M. aquifolium*, Lorenzi e Matos (2008) afirmam que esta espécie possui
251 características e propriedades muito similares ao da espécie *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss,
252 como a presença de terpenóides, taninos, alcalóides, macrolídeos e flavonóides (Martins *et*
253 *al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2009).

254 O extrato etanólico de *O. spixiana* apresentou atividade inibitória sobre os
255 sorovares, e em contrapartida, Bara e Veneti (1998) relataram que o extrato alcoólico de
256 casca de *O. spixiana* a 3% sobre *S. Typhimurium* não exerceu qualquer efeito
257 antibacteriano. Essa discordância dos dados pode ser atribuída à baixa concentração em
258 que o extrato foi testado no trabalho anterior, e pela parte vegetal utilizada para o extrato
259 ser a casca, e não a folha como no presente trabalho. Além disso, a composição dos
260 extratos pode também variar de acordo com as condições ambientais, estações do ano em
261 que foram coletadas, bem como, às diferentes técnicas empregadas para avaliação da
262 atividade, por não haver uma padronização internacional para avaliação de extratos
263 vegetais (Alves *et al.*, 2008; Santurio *et al.*, 2011).

264 Informações sobre os sorovares de *Salmonella* presentes no ambiente avícola,
265 quanto à incidência, resistência a antimicrobianos e procedência são importantes fatores
266 para o controle de contaminação e transmissão. A verificação de que a atividade dos
267 extratos de *M. cauliflora*, *P. guajava*, *M. aquifolium*, *R. communis*, *O. spixiana* e *S. molle* é
268 independente da suscetibilidade ou não aos antibacterianos testados é uma importante
269 constatação para incentivar a futura utilização dos extratos vegetais em substituição aos
270 antimicrobianos comerciais usados na alimentação de aves.

271 Testes de toxicidade devem ser os próximos passos para atestar a segurança no
272 uso dos extratos vegetais com potencial antimicrobiano. Rizzo *et al.*(2010) relatam que
273 dietas de frango de corte contendo misturas de extratos vegetais promovem desempenho
274 semelhante ao obtido com dietas contendo antibióticos, sem qualquer efeito sobre as
275 características de carcaça e a utilização da energia e da proteína das dietas, demonstrando a
276 segurança da sua utilização em substituição aos antibióticos convencionais.

277 Com isso, espera-se que o presente estudo contribua para busca de produtos
278 alternativos que assegurem a produção avícola, baseados em um cultivo sustentável, que
279 respeitam o meio ambiente e que reduzam as contaminações produzidas por salmonelas no
280 ambiente de criação aviário.

281

282 **CONCLUSÃO**

283

284 Os extratos de *Myrciaria cauliflora*, *Psidium guajava*, *Maytenus aquifolium*,
285 *Ricinus communis*, *Ocotea spixiana* e *Schinus molle* apresentaram atividade inibitória em
286 diferentes concentrações sobre os sorovares de *Salmonella* variando de acordo com o
287 solvente extrator. A suscetibilidade aos extratos variou entre os sorovares de *Salmonella*,
288 independente da resistência aos antimicrobianos testados.

289

290 **AGRADECIMENTOS** – Ao Dr. Alberto Bach por ter cedido os sorovares de
291 *Salmonella* , a Capes, a Fundação Araucária e CNPq.

292

293 **REFERÊNCIAS**

294

- 295 ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A. *et al.* Estudo comparativo de
296 técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de
297 espécies vegetais e de substâncias puras. *Quím. Nova*, v. 31, p. 1224-1229, 2008.
- 298 BARA, M.T.F.; VANETTI, M.C.D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas
299 medicinais, aromáticas e corantes naturais. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 7/8, n.1, p. 21-34,
300 1998.
- 301 CAFFARINI, P.; CARRIZO, P.; PELICANO, A. *et al.* Efectos de extractos acetónicos y
302 acuosos de *Ricinus communis* (ricino), *Melia azedarach* (paraíso) y *Trichillia glauca*
303 (*trichillia*), sobre la hormiga negra común. *Idesia*, v.26, p.59-64, 2008.
- 304 CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I. *et al.* High prevalence of multiple
305 resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in
306 Spain. *Vet. Microbiol.*, v.104, p.133-139, 2004.
- 307 CARVALHO, C.M.; MACEDO-COSTA, M.R.; PEREIRA, M.S.V. *et al.* Efeito
308 antimicrobiano in vitro do extrato de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg.]
309 sobre *Streptococcus* da cavidade oral. *Rev. Bras. Plantas Med.*, Botucatu, v.11, n.1, p.79-
310 83, 2009.
- 311 CASTRO, M.S; PILGER, D.; FERREIRA, M.B.C. *et al.* Trends in antimicrobial
312 utilization in a university hospital, 1990-1996. *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo-SP, v.36, n. 5,
313 p. 553-558, 2002.
- 314 CLSI, Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
315 Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Document
316 M100-S17, v.27, n.1, 2007.
- 317 COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, p.
318 564-582, 1999.
- 319 DUARTE, M.C.T; FIGUEIRA, G.M; PEREIRA, B. *et al.* Atividade antimicrobiana de
320 extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais, *Rev. Bras.*
321 *Farmacognosia*, v. 14, n. 1, p. 06-08, 2004.

- 322 FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular
323 brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev. Bras.Farmacogn.*, v.42, n.3, 2006.
- 324 FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI, E. *et al.* Atividade antimicrobiana
325 de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella*
326 D.C. (Asteraceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 17, n. 2, p.224-230, 2007.
- 327 FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 66, p.365-78,
328 1989.
- 329 GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da
330 atividade antimicrobiana de extratos vegetais de algumas árvores nativas. *Arq. Inst. Biol.*,
331 São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.
- 332 GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its
333 traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, v.117, p.1-27,
334 2008.
- 335 HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: Generalidades E
336 Aspectos Básicos. In: Yunes, B.C.; Calixto, J.B (orgs). *Plantas medicinais sob a ótica da*
337 *moderna química medicinal*. 1^a ed. Florianópolis/Porto Alegre, Ed.
338 Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. 2002. p.651-661.
- 339 KOTTWITZ, L.B.M.; BACK, A.; LEÃO, J.A. *et al.* Contaminação por *Salmonella* spp. em
340 uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arq. Bras. Med.*
341 *Vet. Zootec.*, v.60, p.496-498, 2008.
- 342 LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C. *et al.* Atividade antibacteriana de
343 extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Cienc. Rural*,
344 v. 35, p. 371-376, 2005.
- 345 LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas*. Nova
346 Odessa (SP): Instituto Plantarum, 2008. 544 p.
- 347 MACEDO-COSTA, M.R.; DINIZ, D.N.; CARVALHO C.M. *et al.* Eficácia do extrato de
348 *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. *Rev. Bras.*
349 *Farmacogn.*, 19(2B), p. 565-571, 2009.

- 350 MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. *et al.* Plantas medicinais. 3^a
351 Ed. Viçosa, UFV, 2000. p.220.
- 352 MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMOES, C.M.O. (Ed). *Farmacognosia: da*
353 *planta ao medicamento.* 4^a ed. Florianópolis/Porto Alegre, Ed.Universidade/UFRGS/Ed. da
354 UFSC, Cap. 24. 2002. p. 527-540.
- 355 NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. *et al.* Antibacterial activity of
356 plant extracts. *Braz. J. Microbiol.*, v.31, p.247-256, 2000.
- 357 OLIVEIRA, R.S.; CUNHA, S.C.; COLAÇO W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex
358 Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Rev. Bras.*
359 *Farmacogn.*, v. 19, n.2b, p.650-659, 2009.
- 360 REYNERTSON, K. A. *Phytochemical analysis of bioactive components from edible*
361 *Myrtaceae fruits.* New York, 2007. Dissertação PhD, The City University of New York-
362 E.U.A, 2007. Disponível em: [http://www.home.earthlink.net/~phytochemistry/](http://www.home.earthlink.net/~phytochemistry/archive/Reynertson_dissertation_final_11_15_2006.pdf)
363 [archive/Reynertson_dissertation_final_11_15_2006.pdf](http://www.home.earthlink.net/~phytochemistry/archive/Reynertson_dissertation_final_11_15_2006.pdf)> Acessado em: 5 jun. 2010.
- 364 RIZZO, P.V.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M.C. *et al.* Extratos vegetais em dietas
365 para frangos de corte. *R. Bras. Zootec.*, v.39, n.4, p.801-807, 2010.
- 366 SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; SCHIAVINI, M.S. *et al.* Na Evaluation of
367 antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.48, n. 3, p.
368 429-36, 2005.
- 369 SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMOES,
370 C.M.O. (Ed). *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 4a. ed. Florianópolis/Porto
371 Alegre, Ed.Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. 2002. p.333-355.
- 372 SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus*
373 *ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades
374 farmacológicas. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, n.2b, João Pessoa, p.650-659, 2009.
- 375 SANTURIO, D. F.; COSTA, M. M.; MABONI, G. *et al.* Atividade antimicrobiana de
376 óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e
377 bovinos. *Cienc. Rural*, v.41, n.6, 2011.

- 378 SANTURIO, M.J.; SANTURIO, D.F.; POZZATI, P. *et al.* Atividade antimicrobiana
379 dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente à sorovares de *Salmonella* de
380 origem avícola. *Ciênc. Rural*, ano 37, n. 3, p. 803-808, mai./jun., 2007.
- 381 SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C. *et al.* *Salmonella* spp.,
382 importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Rev. C. S. Col.*, vol.13, n.5, p. 1675-
383 1683, 2008.
- 384 USHIMARU, P.I.; SILVA, M.T.N.; DI STASI, L.C.; *et al.* Antibacterial activity of
385 medicinal plant extract. *Braz. J. Microbial.*,v. 38, p. 717-719, 2007.
- 386 VARGAS-ALVAREZ, D.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V.A.
387 *et al.* Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava*
388 L.). *Agrociência*, v. 40, p. 109-115, 2006.
- 389 WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C.; AVANCINI, C.A.M. *et al.* Inibição e inativação in
390 vitro de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou
391 condimentar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 1, p. 119-127, 2009.

6. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M.; LERTWORAPREECHA, M.; EVANS, M.C.; BANGTRAKULNONTH, A.; CHALERMCHAIKIT, T.; HENDRIKSEN, R.S.; WEGENER, H. C. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 715-718, 2003.

BARBOSA, T.M.; LEVY, S.B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p. 303-31, 2000.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v.26, p.523-530, 2003.

BOERLIN, P.; REID-SMITH, R.J. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. **Animal Health Research Reviews**, v.9, p.115–126, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007, Regulamento Técnico Para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana. Disponível em <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25959>>. Acesso em 16 ago. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 193, 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola e cria o Comitê Consultivo do PNSA. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2635>>. Acesso em 20 set. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001:45 – 53.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise Epidemiológica de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2008. Disponível em:

<<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>>. Acessado em: 22 set. 2011.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, dez., 2005.

CASTRO, M.S; PILGER, D.; FERREIRA, M.B.C.; KOPITKE, L. Trends in antimicrobial utilization in a university hospital, 1990-1996. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo-SP, v.36, n. 5, p. 553-558, 2002.

CLSI, Clinical And Laboratory Standards Institute (Antigo NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por difusão em ágar para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 8ª ed. Brasília, DF: ANVISA. NCCLS Document M2-A8, v. 23 n. 1, 2003.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S16. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.157-163, 2006.

DAI PRA, M.A.; CORRÊA, E.K.; ROLL, V.F.; XAVIER, E.G.; LOPES, D.C.N.; LOURENÇO, F.F.; ZANUSSO, J.T.; ROLL, A.P. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 39, n. 4, jul., 2009.

DUARTE, M.C.T; FIGUEIRA, G.M; PEREIRA, B; MAGALHÃES, P.M; DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de

espécies da coleção de plantas medicinais, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 06-08, 2004.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-78, 1989.

MANIE, T.; KHAN, S.; BROZEL, V.S. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in south Africa. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 253-258, 1997.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Fomento e Fiscalização da Produção animal/Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Site: www.anvisa.org. DFPA/SARC/ MAPA, 2004.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 2, n. 10, p. 24-28, set./out. 1999.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C. FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 42, p.465-470, 2005.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANECO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais, 2008. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, abr./jun., 2008.

OTHMAN, M.; LOH, H.S.; WIART, C.; KHOO, T.J.; LIM, K.H.; TING, K.N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 161–166, 2011.

RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 237–247, 2001.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n.2, p. 57-69, 2001.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1259-1262, 2008.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MACGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. Distribution of oxytetracycline plasmids between Aeromonads in hospital and aquaculture environments: implications of Tn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, 2000.

SAKARIDIS, I.; SOULTOS, N.; IOSSIFIDOU, E. *et al.* Prevalence and Antimicrobial resistance of serovars from chicken carcasses in Northern Greece. **Journal of Food Safety**, v.31, p.203-210, 2011.

SANTURIO, M.J.; SANTURIO, D.F.; POZZATI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. **Ciência Rural**, ano 37, n. 3, p. 803-808, mai./jun., 2007.

SILVA, J.A.; SOARES, L.F.; COSTA, E.L. Sanitização de carcaças de frango com soluções de ácidos orgânicos comerciais e suco de limão. **Revista Tecnologia de Carnes**, v.3, n.1, p.19-26, 2001.

SINDIAVIAPAR. Sindicato e Associação dos Abatedouros e Produtores Avícolas do Paraná. Ed. nº 23 Jul/Ago 2011. Disponível em: < http://painel.ubis.com.br/clientes/sindiavipar/pdfs/23_edicao.pdf> Acesso 22 nov 2011.

SINDIAVIAPAR. Sindicato e Associação dos Abatedouros e Produtores Avícolas do Paraná. Ed. nº 24 Set/Out 2011. Disponível em: < http://painel.ubis.com.br/clientes/sindiavipar/pdfs/24_edicao.pdf> Acesso 22 nov 2011.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.A.; GARRITY, G.M.; EUZEBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521–524, 2005.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**, 6^a. ed. Artmed, 2000, p. 308.

TURNER, A.K.; LOVELL, M.A.; HULME, S.D.; ZHANG-BARBER, L.; BARROW, P.A. Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2099-2106, mai., 1998.

UBABEF. União Brasileira de avicultura. Relatório Anual 2010/2011, 2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php>. Acessado em: 22 nov. 2011.

UTIYAMA, C.E. Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém-desmamados, 2004. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP, 2004.

WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C.; AVANCINI, C.A.M.; GONÇALVES, A.R. Inibição e inativação in vitro de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, fev., 2009.

ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, pp. 221–225, 2001.

ANEXOS

Anexo 1 - Normas da Revista Cap. 1

Revista Arquivos do Instituto Biológico

Normas Editoriais

A **Revista Arquivos do Instituto Biológico** aceita, para submissão, artigos originais de pesquisa científica em sanidade animal e vegetal voltados ao agronegócio e suas implicações no agroambiente, incluindo nesse escopo a qualidade e a segurança alimentar. Aceita, também, artigos sobre pragas sinantrópicas. Todos os trabalhos devem se enquadrar nas normas redatoriais.

Os trabalhos enviados para publicação deverão ser inéditos e destinados exclusivamente a esta Revista. A matéria publicada será de inteira responsabilidade do(s) autor(es). Os trabalhos não aceitos para publicação serão comunicados aos autores pelo Comitê Editorial.

O Comitê Editorial fará análise dos trabalhos antes de submetê-los aos Consultores Científicos.

A publicação dos trabalhos dependerá da análise efetuada pelo Corpo de Consultores Científicos e da aprovação do Comitê Editorial.

Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

Serão considerados para publicação Artigos Científicos e Comunicações Científicas. Artigos de Revisão poderão ser aceitos a critério do Comitê Editorial.

A transcrição parcial ou total de trabalhos dos "Arquivos do Instituto Biológico" para outras revistas é permitida desde que citada a origem.

O original deve ser submetido apenas na forma eletrônica através do e-mail arquivos@biologico.sp.gov.br. O arquivo não deverá exceder 2Mb. No e-mail de encaminhamento deverá constar nome por extenso, endereço completo (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, endereço postal), endereço eletrônico e **CPF de todos os autores**.

Eventuais dúvidas podem ser encaminhadas ao editor da Revista "Arquivos do Instituto Biológico", Dra. Silvia Regina Galleti, Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP - Fone: (11) 5087 -1749, (11) 5087-1749 - E-mail: arquivos@biologico.sp.gov.br.

A versão impressa da revista será publicada exclusivamente em preto e branco. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis para consulta e download gratuitos no site da revista www.biologico.sp.gov.br/arquivos.

A taxa para publicação na revista “Arquivos do Instituto Biológico” é de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) por página diagramada. Após o aceite do trabalho, comunicado pelo editor responsável, os autores deverão efetuar o depósito do valor correspondente à publicação em nome da Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ 50.276.237/0001-78) (Banco do Brasil (001), Agência 1199-1, Conta Corrente 30.200-7 ou Banco Banespa (033), Agência 0637, Conta Corrente 13-001316-9). Enviar comprovante de depósito, via carta, fax ou e-mail, mencionando o número do trabalho, para o seguinte endereço:

Revista Arquivos do Instituto Biológico. Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP – Fone: (11) 5087-1749, (11) 5087-1749/ Fax: (11) 5087-1790 – E-mail:arquivos@biologico.sp.gov.br

Forma de apresentação: os trabalhos deverão ser digitados em Word 97 ou versão superior, página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em seqüência. As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página. O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

Artigo de revisão: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Artigo científico: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

Comunicação científica: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores,

resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Quando o trabalho envolver estudos em animais de experimentação e/ou organismos geneticamente modificados, incluir o número do processo no trabalho e encaminhar uma cópia da aprovação fornecida pelo respectivo Comitê responsável da Instituição de origem do primeiro autor.

Idioma: o trabalho poderá ser redigido em português, espanhol ou inglês. Quando escrito em português, o resumo deverá ter uma versão em inglês. No caso de artigo escrito em inglês ou espanhol deverá ter um resumo em inglês ou espanhol e outro em português.

Título: embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focalizando bem a sua finalidade principal.

Endereço(s) do(s) autor(es): abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), com chamada numérica. Descrever endereço postal (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, estado, país) e eletrônico do autor principal. No rodapé da primeira lauda descrever somente a Instituição e Departamento dos demais autores.

Resumo: deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

Palavras-chave: abaixo do resumo e separado por um espaço, citar no máximo cinco palavras-chave, separadas por vírgula. Evitar termos que apareçam no título.

Abstract: apresentar uma tradução para o inglês, do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês (ou espanhol) as mesmas palavras-chave (key words, palabras-clave) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

Introdução: descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

Material e Métodos: apresentar descrição breve, porém suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

Resultados: apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

Discussão: discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

Tabelas e Figuras: incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 Kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura.

Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusões: serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

Agradecimentos: poderão ser incluídos a pessoas ou instituições.

Referências e citações no texto: citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências, exceção para informações obtidas por canais informais que deverão ser citadas apenas no texto: (JUNQUEIRA, comunicação pessoal), (JUNQUEIRA, informação verbal). A referência no texto deve seguir o sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em caixa alta reduzida ou versalete, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores – LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES; MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE *et al.* (1990) ou (BESSE *et al.*, 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). Nas referências seguir as recomendações da Norma NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); as referências deverão estar em ordem alfabética de primeiro autor e serem apresentadas em folha à parte. A exatidão dos dados nas referências é da responsabilidade dos autores.

Senhores autores,

Para submissão de trabalhos aos processos editoriais da revista “Arquivos do Instituto Biológico”, favor encaminhá-los por meio do endereço:

arquivos@biologico.sp.gov.br

Atenciosamente,

Silvia Regina Galleti

Editor-Chefe

Anexo 2 - Normas da Revista Cap. 1 e 3

Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

ISSN 0102-0935 *versão impressa*

ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Política editorial

Publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o

sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: *National Academy of Sciences*, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-Related-Articles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Submissão dos trabalhos

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico www.abmvz.org.br

Taxas de publicação

Taxa de submissão. O pagamento, no valor de R\$30,00, será feito por meio de boleto bancário (emitido quando da submissão do artigo). O autor deverá informar os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.