



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ INSTITUTO DE
BIODIVERSIDADE E FLORESTAS BACHARELADO
INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO**

IANI TEIXEIRA CORRÊA

**ANÁLISE DA EFICÁCIA DO EXTRATO DA FOLHA DA
AMENDOEIRA-DA-PRAIA (*Terminalia catappa*) SOBRE O
CRESCIMENTO DA *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus*
*aureus***

**Santarém, Pará
2019**

IANI TEIXEIRA CORRÊA

**ANÁLISE DA EFICÁCIA DO EXTRATO DA FOLHA DA
AMENDOEIRA-DA-PRAIA (*Terminalia catappa*) SOBRE O
CRESCIMENTO DA *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus*
*aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de graduação em Ciências Agrárias para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de
Biodiversidade e Florestas.
Orientador: Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano

**Santarém, Pará
2019**

IANI TEIXEIRA CORRÊA

**ANÁLISE DA EFICÁCIA DO EXTRATO DA FOLHA DA
AMENDOEIRA-DA-PRAIA (*Terminalia catappa*) SOBRE O
CRESCIMENTO DA *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus
aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de graduação em Ciências Agrárias para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano

Conceito: 8,2

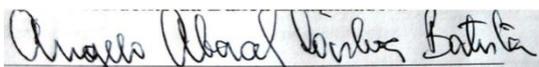
Data de Aprovação: 14/12/2019



Prof.º Dr. Gustavo da Silva Claudiano
Universidade Federal do Oeste do Pará



Prof.º Me. Jairo Augusto Sousa Araújo
Universidade Federal do Oeste do Pará



Tec. Ângelo Abaal Lisboa Batista
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dedico a Deus criador de todas as coisas,
Aos meus queridos e amados pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e por ter me dado forças para não desistir e conseguir concluir essa etapa da minha jornada. Agradeço minha mãe Maria de Fátima, meu pai Alemar e minha irmã Ingrid por nunca me abandonarem e me incentivarem a cada dia, sempre acreditando e torcendo por mim. Amo vocês.

Ao meu querido Roberto, por todo o apoio e palavras de incentivo, não me deixando desanimar mesmo nos momentos difíceis.

Não poderia esquecer de agradecer aos meus amigos queridos, em especial Ana Maria, Aline Maia, Eloise Marcelle (que foi um raio de esperança no decorrer do meu trabalho), Damyres Siqueira, Ângelo Abaal, Mônica Rêgo, Elias Almeida e Maévem Campos (que além de amiga foi minha companheira nessa árdua jornada, tivemos momentos de risos e choros que hoje ficam como uma lembrança em nossas vidas) e por todo o carinho e companheirismo nessa jornada, muito obrigada!

A Prof^a Dra. Kelly Castro e a técnica Bruna Martins do laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais e Bioativos pela paciência e ajuda na realização de minhas análises. Muito obrigada!

Ao Lucas Alvarenga do laboratório de microbiologia por toda a paciência e ajuda em minhas análises e no decorrer do meu trabalho, obrigada pelas dicas e ajuda, mesmo estando muito atarefado. Muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano por ter aceitado me orientar e pela oportunidade de ter novos conhecimentos. A Prof. Dra. Alanna do Socorro Lima da Silva pelos conselhos e por toda a ajuda que me deu ao longo de minha jornada. Muito Obrigada!

Aos não amigos que indiretamente contribuíram para o sucesso de minha jornada ao longo desses anos.

A todos, que contribuíram de alguma forma, minha sincera gratidão!

RESUMO

O uso de produtos naturais como forma de diminuir o uso de químicos na produção vem ganhando destaque nos meios de produção animal. O presente estudo teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana dos extratos das folhas secas da *Terminalia catappa in vitro* sobre a capacidade antimicrobiana no crescimento da *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. As cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* utilizadas foram isoladas de peixes naturalmente infectados, com lesões compatíveis com aeromonose, proveniente de piscicultura comercial, as bactérias foram reativadas por cultivo *overnight* em caldo TSB e então cultivada em meio ágar tripton de soja por 18 horas e suspensas em salina NaCl 0,9% até a concentração 0,5 da escala MacFarland. Para obtenção do extrato foi pesada 60 gramas do material moído envolvido em um papel filtro (Whatman) e feito uma extração a quente no aparelho extrator de Soxhlet com o auxílio do solvente a base de álcool etílico PA, em seguida o extrato foi evaporado em um evaporador rotativo e armazenado em frascos. Foi utilizada quatro concentrações de 100mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada e 200mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada, para os testes *in vitro* foi utilizado placas de petri (150x20 mm) contendo 60 ml de ágar Mueller Hinton (KASVI), sendo preparadas e inoculadas com a suspensão de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* com o auxílio de swab. Após isso, discos de papel de 6 mm foram inoculados com 10 µl dos extratos testados e colocados sobre a placa previamente confeccionada, onde também foram adicionados discos sem inoculação de extratos sendo esse o controle negativo e o antibiótico clororanfenicol (30µg) utilizado como controle positivo. O ensaio foi feito em 3 repetições cada. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e posteriormente avaliou-se a formação de halos de inibição ao redor dos discos. Os resultados demonstraram que as concentrações do extrato da *Terminalia catappa* (100 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada e 200 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada) não apresentaram a formação do halo de inibição.

Palavra-chaves: fitoterápicos; piscicultura; antimicrobiano, patogenias

ABSTRACT

The use of natural products as a way to reduce the use of chemicals in production has been gaining prominence in the means of animal production. The present study aimed to analyze the antimicrobial activity of Terminalia catappa dry leaf extracts in vitro on the antimicrobial growth capacity of Aeromonas hydrophila and Staphylococcus aureus. The strains of Aeromonas hydrophila and Staphylococcus aureus used were isolated from naturally infected fish with lesions compatible with aeromonose from commercial fish culture. The bacteria were reactivated by overnight cultivation in TSB broth and then cultivated on soybean tryptone agar for 18 hours. suspended in 0.9% NaCl saline to the MacFarland 0.5 concentration. To obtain the extract, 60 grams of the ground material wrapped in a filter paper (Whatman) was weighed and hot extracted in the Soxhlet extractor apparatus with the aid of the PA alcohol solvent, then the extract was evaporated in a rotary evaporator and stored in vials. Four concentrations of 100mg of sample for 2.5 and 5 ml of distilled water and 200mg of sample for 2.5 and 5 ml of distilled water were used for in vitro tests. Petri dishes (150x20 mm) containing 60 ml were used. of Mueller Hinton agar (KASVI), being prepared and inoculated with the suspension of Aeromonas hydrophila and Staphylococcus aureus with the aid of swab. After that, 6 mm paper discs were inoculated with 10 µl of the tested extracts and placed on the previously prepared plate, where discs without inoculation of extracts were also added. The assay was done in 3 repetitions each. The plates were incubated at 37 ° C for 24 hours and the formation of inhibition halos around the discs was evaluated. The results showed that the concentrations of Terminalia catappa extract (100 mg sample for 2.5 and 5 ml distilled water and 200 mg sample for 2.5 and 5 ml distilled water) showed no inhibition halo formation.

Keywords: herbal remedy; pisciculture; antimicrobial; pathogeny

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	12
Resultados e Discussões	13
Conclusão	15
Referências	15
ANEXOS.....	17
1. NORMAS DA REVISTA CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA.....	17
2. FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO.....	22

ANÁLISE DA EFICÁCIA DO EXTRATO DA FOLHA DA AMENDOEIRA-DA-PRAIA (*Terminalia catappa*) SOBRE O CRESCIMENTO DA *Aeromonas hydrophila* E *Staphylococcus aureus*

EFFECTIVENESS ANALYSIS OF THE ALARM OF THE BEACH ALMOND (*Terminalia catappa*) LEAF EXTRACT ON THE GROWTH OF *Aeromonas hydrophila* AND *Staphylococcus aureus*.

Resumo

O uso de produtos naturais como forma de diminuir o uso de químicos na produção vem ganhando destaque nos meios de produção animal. O presente estudo teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana dos extratos das folhas secas da *Terminalia catappa in vitro* sobre a capacidade antimicrobiana no crescimento da *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. As cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* utilizadas foram isoladas de peixes naturalmente infectados, com lesões compatíveis com aeromonose, proveniente de piscicultura comercial, as bactérias foram reativadas por cultivo *overnight* em caldo TSB e então cultivada em meio ágar triptona de soja por 18 horas e suspensas em salina NaCl 0,9% até a concentração 0,5 da escala MacFarland. Para obtenção do extrato foi pesada 60 gramas do material moído envolvido em um papel filtro (Whatman) e feito uma extração a quente no aparelho extrator de Soxhlet com o auxílio do solvente a base de álcool etílico PA, em seguida o extrato foi evaporado em um evaporador rotativo e armazenado em frascos. Foi utilizada quatro concentrações de 100mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada e 200mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada, para os testes *in vitro* foi utilizado placas de petri (150x20 mm) contendo 60 ml de ágar Mueller Hinton (KASVI), sendo preparadas e inoculadas com a suspensão de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* com o auxílio de swab. Após isso, discos de papel de 6 mm foram inoculados com 10 µl dos extratos testados e colocados sobre a placa previamente confeccionada, onde também foram adicionados discos sem inoculação de extratos sendo esse o controle negativo e o antibiótico clororanfenicol (30µg) utilizado como controle positivo. O ensaio foi feito em 3 repetições cada. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e posteriormente avaliou-se a formação de halos de inibição ao redor dos discos. Os resultados demonstraram que as concentrações do extrato da *Terminalia catappa* (100 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada e 200 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada) não apresentaram a formação do halo de inibição.

Palavra-chaves: fitoterápicos; piscicultura; antimicrobiano, patogenias

Abstract

The use of natural products as a way to reduce the use of chemicals in production has been gaining prominence in the means of animal production. The present study aimed to analyze the antimicrobial activity of *Terminalia catappa* dry leaf extracts *in vitro* on the antimicrobial growth capacity of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*. The strains of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* used were isolated from naturally infected fish with lesions compatible with aeromonose from commercial fish culture. The bacteria were reactivated by overnight cultivation in TSB broth and then cultivated on soybean tryptone agar for 18 hours. suspended in 0.9% NaCl saline to the MacFarland 0.5 concentration. To obtain the extract, 60 grams of the ground material wrapped in a filter paper (Whatman) was weighed and hot extracted in the Soxhlet extractor apparatus with the aid of the PA alcohol solvent, then the extract was evaporated in a rotary evaporator and stored in

vials. Four concentrations of 100mg of sample for 2.5 and 5 ml of distilled water and 200mg of sample for 2.5 and 5 ml of distilled water were used for in vitro tests. Petri dishes (150x20 mm) containing 60 ml were used. of Mueller Hinton agar (KASVI), being prepared and inoculated with the suspension of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* with the aid of swab. After that, 6 mm paper discs were inoculated with 10 µl of the tested extracts and placed on the previously prepared plate, where discs without inoculation of extracts were also added. The assay was done in 3 repetitions each. The plates were incubated at 37 ° C for 24 hours and the formation of inhibition halos around the discs was evaluated. The results showed that the concentrations of *Terminalia catappa* extract (100 mg sample for 2.5 and 5 ml distilled water and 200 mg sample for 2.5 and 5 ml distilled water) showed no inhibition halo formation.

Keywords: herbal remedy; pisciculture; antimicrobial; pathogeny

Introdução

A piscicultura no Brasil tem demonstrado um grande crescimento nos últimos anos, segundo Camargo e Pouey (2005) o desenvolvimento de tecnologias de insumos na produção, as grandes áreas de lâmina d'água disponíveis e pequena variação de temperatura anual são fatores que vem contribuindo para o crescimento da atividade no país. Dados da Associação Brasileira da Piscicultura mostram que em 2018 o Brasil chegou a produzir cerca de 722.560 toneladas do produto, gerando uma receita de aproximadamente 5,6 bilhões, sendo a Tilápia do Nilo a principal espécie criada em cativeiro com cerca de 169, 3 toneladas, seguida do Tambaqui com cerca de 88,7 toneladas, destacando-se a região a centro-oeste que vem mostrando uma grande produção em relação as demais regiões.

Segundo a FAO (2013), o Brasil ocupa a 12^o posição no ranking dos 15 maiores produtores da aquicultura mundial. Devido a expansão do mercado e a busca por fontes de alimentos mais saudáveis, a piscicultura ganhou uma forte intensificação buscando atender as necessidades da população, para isso os produtores buscaram formas de aumentar a produção, utilizando um número maior de animais por tanque, causando o adensamento desses animais facilitando a transmissão de doenças, acarretando em queda na produção e um elevado custo de manutenção. Segundo Pavanelli *et al.* (2008) as principais doenças que podem afetar os animais podem ser provocadas por parasitas, platelmintos, bactérias e nematoides. Bactérias como *Aeromonas hydrophila* (gram-negativa) é uma bactéria heterotrófica, encontrada principalmente em climas quentes. Pode também ser encontrada em águas marinhas, doces, marinhas, estuarinas, clorinadas ou não-clorinadas. Pode sobreviver em ambientes aeróbicos ou anaeróbicos. e *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na

pele, são causadores de patogenias na piscicultura, podendo ser encontradas tanto nas fontes naturais de água, no solo e na manipulação e transporte desses animais.

Para se combater as patogenias causadas por essas bactérias se faz uso de produtos químicos, sendo que seu uso pode trazer algum efeito tóxico aos tecidos dos peixes e pode acumular resíduos na musculatura, oferecendo risco potencial ao consumidor caso não sejam respeitados os tempos de carência pós-tratamento, podendo causar contaminações no solo e lençóis freáticos dependendo da concentração acumulada (TAVECHIO *et al.*, 2009). Além disso, o uso de antibióticos na produção animal tornou-se um problema de saúde pública e animal devido à resistência antimicrobiana, gerando inclusive a recomendação da restrição completa de antimicrobianos para promoção do crescimento, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (TANG *et al.*, 2017). Logo, o uso de fitoterápicos surge como uma alternativa ao tratamento com antibióticos, haja vista que produz um menor impacto ambiental, reduz a quantidade de resíduos químicos nos animais, são menos tóxicos e possuem diversas propriedades biológicas capazes de impedir o crescimento e disseminação de patógenos (FUJIMOTO, 2012). Os extratos vegetais têm mostrado efeitos positivos na produção animal e esses estão associados aos princípios ativos presentes nas plantas (SANTANA *et al.*, 2015). Estes são preparações líquidas ou em pó obtidas da retirada dos princípios ativos das drogas vegetais por diversas metodologias (MARQUES, 2005). Na piscicultura o uso de fitoterápicos vem ganhando destaque na área da sanidade, onde essas preparações são utilizadas para combater os danos causados por essas bactérias (YUNIS-AGUINAGA *et al.*, 2016). *In vitro* esses extratos são testados por meio de disco-difusão, onde a difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano (SEJAS *et al.* 2002).

Uma das plantas que se tornou uma fonte de tratamento natural é a *Terminalia catappa*, segundo PATRO (2013), a Castanhola é uma árvore que pertence à família Combretaceae, típica de regiões tropicais. Também é conhecida como sete-copas, chapéu-de-sol e castanheira. É uma árvore de crescimento rápido podendo crescer de 12 a 35 metros, bem resistente e suas folhas mudam de verde para um tom mais avermelhado quando estão perto de cair e podem ser usadas para fins medicinais, pois possuem várias substâncias ativas como o Tanino, que são polifenóis de origem vegetal que servem como uma proteção contra o ataque de alguns herbívoros e de microrganismos patogênicos. Assim, o presente trabalho objetivou analisar a atividade antimicrobiana dos extratos das folhas secas da *Terminalia*

catappa *in vitro* sobre a capacidade antimicrobiana no crescimento da *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*.

Material e Métodos

Obtenção e Preparo do Extrato

As folhas maduras da *Terminalia catappa* foram coletadas no período de Fevereiro de 2019 a Maio de 2019. Após coletadas, essas folhas foram levadas para o laboratório de bromatologia (IBEF/UFOPA), onde se realizou assepsia com álcool 70 e posteriormente foram pesadas em balança semi-analítica e secas em estufa de circulação forçada a 45° entre 48 a 72 horas, até que apresentassem aspecto crocantes ou quebradiço, indicando a perda de umidade, com avaliação a cada 12 horas. Após serem retiradas da estufa foram moídas em moinho de facas do tipo Willey com peneira de 2 mm e armazenadas em recipientes fechados. Para a obtenção do extrato, a amostra foi levada para o laboratório de pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais e bioativos – PDBio, onde foi pesada 60 gramas do material moído envolvido em um papel filtro (Whatman) e feito uma extração a quente no aparelho extrator de Soxhlet com o auxílio do solvente a base de álcool etílico PA, em seguida o extrato foi evaporado em um evaporador rotativo e armazenado em frascos.

Para obtenção da massa do extrato, o resíduo oriundo da evaporação foi adicionado em placas de petri e foram secos com um secador, resultando na evaporação do restante do álcool sobrando, apenas o extrato concentrado que foi utilizado para preparar as substâncias testes. Para fazer cada concentração foram utilizadas 100mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada e 200mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada. Para se obter uma melhor homogeneização o material foi colocado em um banho ultrassônico por 10 segundos.

Obtenção das Bactérias

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados, com lesões compatíveis com aeromonose, proveniente de piscicultura comercial. Para tanto, os animais foram coletados e transportados até o Laboratório de Sanidade Animal (LARSANA), IBEF/UFOPA. Após a chegada, os animais sofreram eutanásia por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory,

Steinheim, Alemanha), 100 mg L⁻¹ (bem-estar animal e ISO- Organização Internacional para Padronização, 2006).

Durante a necropsia foram colhidos assepticamente fragmentos de encéfalo, rim, fígado e baço para cultura bacteriológica. Amostras coletadas, esses fragmentos foram semeadas em placas de Petri, contendo ágar triptona de soja (TSA / Difco®), acrescido com ampicilina (10 mg/L), sendo incubadas por 24 h, a 30 ° C. Após a incubação, as colônias suspeitas foram devidamente identificadas por suas características morfológicas e tintoriais, seguida de métodos bioquímicos e pelo “kit Bactray 3”, sendo então armazenadas em caldo TSB suplementado com glicerol a -80°C. Já a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 14458, foi cedida pela bacterioteca do laboratório de microbiologia/ISCO.

Análise Microbiológica dos Extratos por Diluição em Placa de Petri

O teste foi realizado no laboratório de microbiologia (ISCO/UFOPA). Para o ensaio do potencial antimicrobiano dos extratos de *Terminalia catappa*, as cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* foram reativadas por cultivo *overnight* em caldo TSB (Kasvi®) e então cultivada em meio ágar triptona de soja (TSA / Difco®) por 18 horas e suspendidas em salina NaCl 0,9% até a concentração 0,5 da escala MacFarland. O ensaio seguiu o protocolo descrito pela Clinical and Laboratory Standards Institute, sendo realizado em placas de petri (150x20 mm) contendo 60 ml de ágar Mueller Hinton (KASVI®), sendo preparadas e inoculadas com a suspensão de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* com o auxílio de *swab*. Após isso, discos de papel de 6 mm foram inoculados com 10 µl dos extratos testados e colocados sobre a placa previamente confeccionada, onde também foram adicionados discos sem inoculação de extratos sendo esse o controle negativo e o antibiótico clororanfenicol (30µg) utilizado como controle positivo. O ensaio foi feito em 3 repetições cada. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e posteriormente avaliou-se a formação de halos de inibição ao redor dos discos.

Resultados e Discussões

Os resultados demonstraram que as concentrações do extrato da *Terminalia catappa* (100 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada e 200 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada) não apresentaram a formação do halo de inibição. As bactérias Gram-negativas

possuem uma cápsula que tem a capacidade de protegê-las de muitos antimicrobianos, conferindo maior resistência do que as bactérias Gram-positivas (Schved *et al.* 1994). Apesar das diferenças morfológicas das espécies Grams positivas e negativas, não foi verificado inibição nas concentrações testadas pelo método de extração empregada no presente estudo. Silva *et al.* (2017), avaliando a extração a frio (temperatura ambiente) das folhas maduras da *Terminalia catappa* por remaceração com álcool absoluto com renovação do do líquido extrator no sétimo dia, obteve 3 concentrações (1mg/ml, 10mg/ml e 100mg/ml) para tratamento, onde não houve crescimento de halo inibitório para *Aeromonas hydrophila* o que corroborou com os resultados encontrados no presente estudo.

Silva *et al.* (2017), realizando um estudo utilizando extratos etanólicos e aquosos de *Lippia alba* e *Lippia origanoides*, através de extrações a frio, onde o extrato etanólico foi obtido por maceração estática com álcool etílico 90% e remoção do solvente através de evaporação e extrato aquoso obtido apenas por maceração e diluição em água destilada com posterior filtração a vácuo utilizando cinco isolados de *Aeromonas hydrophila*, sendo uma cepa padrão ATCC, dois isolados de tambaqui (561 e 570), um isolado de pacu e outro de tilápia. Observou que houve apenas atividade nas placas testadas com os extratos etanólicos de *L. alba* e *L. origanoides* sobre os isolados bacterianos, enquanto para os extratos aquosos não foi observada atividade antibacteriana.

Castro (2008), testando alguns extratos metanólicos da *Pêra glabrata* (sete-casca), *Merremia tomentosa* (rosa-pau) e *Inga guidonia* (ingá-do-brejo), não observou formação de halo de halo de inibição frente a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Não se verificou atividade antimicrobiana nas concentrações do extrato da *Terminalia catappa* (100 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada e 200 mg de amostra para 2,5 e 5 ml de água destilada) contra *S. aureus*. Morais *et al.* (2018), realizando estudo sobre extração hidroalcolica da *Terminalia catappa* por meio de maceração, utilizando uma mistura de álcool etílico e água destilada como solvente, obteve resultados satisfatórios na inibição da bactéria nas quatro concentrações utilizadas em 50 mg/mL ($23,6 \pm 1,5$ mm), 25 mg/mL (21 ± 1 mm), 12, mg/mL ($16,3 \pm 1,5$ mm), 6,25 mg/mL (11 ± 1 mm). Em um outro estudo onde foi avaliada a ação antimicrobiana da casca da *Terminalia catappa*, observou-se atividade do extrato sobre *Staphylococcus aureus*, por meio do teste de difusão em ágar, onde a bactéria demonstrou sensibilidade à concentração de 100 mg/mL (7.33 mm \pm 0.58). Essa diferença com os resultados do presente trabalho, mostra que o método de extração é determinante no processo obtenção do princípio ativo com atividade antimicrobiano.

Carvalho *et al.* (2014), avaliando o extrato das flores de camomila através da extração a frio utilizando o solvente polar álcool etílico 96° GL como líquido extrator, obteve um extrato etanólico, e por meio da extração a quente no Soxhlet utilizando o solvente apolar ciclohexano, obteve o extrato de ciclohexano, não apresentou resultados significativos na inibição da bactéria, havendo apenas formação de pequenos halos de 8, 7 e 5 mm nas diluições 1:1 e 1:2 do extrato etanólico, sendo desconsiderado pelo autor.

Gonçalves *et al.* (2005), avaliando a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos das folhas da erva matte e da goiabeira sobre a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, observou a formação de halos de 18 mm para erva matte e 17 mm para a goiabeira, descrevendo-a como sensível com formação de halo. Por se tratar de uma bactéria gram positiva, a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 14458, deveria ter sido sensível ao extrato das folhas da *Terminalia catappa*. Entretanto, os resultados obtidos não descartam a eficiência da espécie em combater o crescimento bacteriano. Visto que, fatores como método de extração e concentrações podem interferir nos resultados das amostras, fazendo com que o extrato não manifeste suas propriedades antibacterianas.

Assim como o presente estudo, os extratos citados acima não conseguiram agir de forma eficiente na inibição de crescimento bacteriano, sendo observado atividade apenas nos extratos etílicos com extração a frio. Os resultados negativos podem ter sido influenciados pelo método de extração, período de coleta ou armazenamento do material.

Conclusão

O extrato alcoólico da folha de amendoeira (*Terminalia catappa L.*) não foi capaz de interferir no crescimento da *Aeromas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* em nenhuma das concentrações testadas. Contudo é necessário a continuidade do estudo sobre esta planta utilizando outros métodos de extração, tendo em vista que a mesma possui características com grande potencial antimicrobiano.

Referências

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aquicultura - um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociências**, 11: 393-396, 2005.

CARVALHO, A. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla L.*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.3, p.521-526, 2014.

CASTRO, S. B. R. et al. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. **Brazilian journal of microbiology**: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 39. 756-60. 10.1590/S1517-838220080004000030, (2008).

CLSI. Clinical and Laboratory Institute. 2019. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories. 29ed. **CLSI guideline M100-S29**. Wayne, PA.

CLSI. Clinical and Laboratory Institute 2015. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing**.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**, Roma, 200p, 2013.

FUJIMOTO, R. Y.; COSTA, H. C.; RAMOS, F. M. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Caricapapaya*). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 5- 10, Jan. 2012.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 74-76, abr./maio/jun. 2005.

MORAIS, Danilo de Araújo et al. Análise da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina – MRSA. **Revista Investigação Biomédica**, São Luís, v. 2, n. 10, p.107-113, fev. 2018. Disponível em: <<http://www.ceuma.br/portalderevistas/index.php/RIB/article/view/243/pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2019.

PATRO, R. **Chapéu-de-sol - Terminalia catappa**. Jardimheiro net, 2013. Disponível em: <<http://www.jardineiro.net/plantas/chapeu-de-solterminalia-catappa.html>>. Acesso em: 10 out. 2019.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, G. C. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3ª Ed. Maringá: Eduem, 3338 p. 2008.

SANTANA, D. C.; SOUZA, T. S.; PIERRO, P. C. C.; AMARAL, A. A. **Uso de plantas medicinais na criação animal**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015.

SCHVED, F.; HENSIS, Y.; JUVEN, B.J. Response of spheroplasts and chelatorpermeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bactericins pedion SJ-1 and nisin. **Int. J. Food Microbiol.**, Washington, v.21, p.305-14, 1994.

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. **Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2002.

SILVA, et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato da folha de amendoeira (*Terminalia catappa* L.)**. 2017

TANG, K. L. et al. **Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and metaanalysis.** The Lancet, v 1(8): 316-317, 2017.

TAVECHIO, W. L. G., GUIDELLI, G., PORTZ, L. 2009 **Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura.** B. Inst. Pesca, São Paulo, 35(2): 335 – 341.

YUNIS-AGUINAGA J. et al. **Dietary camu camu, Myrciaria dubia, enhances immunological response in Nile tilapia.** Fish & Shellfish Immunology, 58: 284-291. 2016.

ANEXO

1. NORMAS DA REVISTA CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e não está sendo avaliada para publicação por outra revista?
2. Os autores estão cientes de que deverão pagar a taxa de submissão e enviar o comprovante de pagamento juntamente com o manuscrito para dar início a tramitação? Veja no tópico Taxas (<https://www.revistas.ufg.br/vet/Fees>)
3. Os autores estão cientes de que são os responsáveis diretos pelo conteúdo de seu artigo?
4. Os arquivos para submissão estão em formatos editáveis: Microsoft Word, OpenOffice ou RTF e o arquivo não ultrapassa 4MB? Submissões com texto em PDF serão sumariamente arquivadas
5. Os nomes e afiliação dos autores foram excluídos do texto do artigo?(usar a opção Propriedades no Word para remover a identificação do autor. Veja instruções sobre esse procedimento em <https://support.office.com/pt-br/article/remover-dados-ocultos-e-informa%C3%A7%C3%B5es-pessoais-por-meio-da-inspe%C3%A7%C3%A3o-de-documentos-apresenta%C3%A7%C3%B5es-ou-pastas-de-trabalho-356b7b5d-77af-44fe-a07f-9aa4d085966f>)
6. O texto está formatado conforme as normas descritas em Diretrizes para Autores?
7. As linhas estão numeradas de maneira contínua e o texto paginado?

8. As Figuras, Gráficos e Tabelas estão inseridas no corpo do texto e em ordem de chamada?
(E não no final do texto)

9. As referências e citações estão de acordo com o estilo Vancouver?

10. O Preenchimento do Cadastro deverá incluir todos os autores envolvidos, afiliação institucional, endereço de E-mail e o ORCID, não podendo ultrapassar o número máximo de nove (9) autores. O contato principal está identificado?

11. É obrigatório anexar a certificação de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para o caso de pesquisa com animais e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) para as pesquisas que tenham aplicação de questionário a pessoas, bem como, a inserção do número dos protocolos respectivos no corpo do texto.

12. A Declaração de Anuência com a assinatura de todos os autores envolvidos está disponível para ser anexado nessa submissão?

13. Os autores estão cientes que, em caso de aprovação para publicação os próprios autores serão, obrigatoriamente, responsáveis pela tradução e revisão linguística que deverá ser feita por empresa certificada, preferencialmente, uma das indicadas pela CAB?

DIRETRIZES PARA AUTORES

No processo de submissão, os autores devem considerar todos os itens listados em condições para submissão. **As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas de imediato.**

1. Alertamos que o cumprimento das diretrizes é um facilitador para o sucesso de sua submissão. Artigos que estejam fora das normas preconizadas serão rejeitados.

2. A Declaração de Anuência, **obrigatória**, deverá ser anexada no ato da submissão.

Deverá conter os nomes de todos os autores, bem como, a instituição afiliada de cada um e com uma breve descrição individual de como o autor participou da referida pesquisa. Veja o modelo da declaração:

MODELO DE DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Os autores abaixo-assinados declaram, para fins de submissão de manuscrito ao periódico Ciência Animal Brasileira, da EVZ/UFG, que o artigo "Título" é original, inédito e não foi submetido a outro periódico.

Carta de Anuência: Os autores expressam sua anuência acerca da submissão, assim como da Política Editorial, das Diretrizes para Publicação e da Declaração de Direito Autoral, que se aplicarão em caso de aceite e posterior publicação do artigo. Ao lado de cada nome e assinatura, consta uma breve descrição de como o autor participou da referida pesquisa.

Cidade, data.

Autores

1. Nome, instituição afiliada, breve descrição da participação, Assinatura
2. Nome, instituição afiliada, breve descrição da participação, Assinatura
3. Nome, instituição afiliada, breve descrição da participação, Assinatura
4. Nome, instituição afiliada, breve descrição da participação, Assinatura
5. Nome, instituição afiliada, breve descrição da participação, Assinatura
6. Nome, instituição afiliada, breve descrição da participação, Assinatura

Nota Científica e Relato de Caso: não estão sendo aceitos no momento.

Revisão de Literatura: somente será publicada quando solicitada por convite e iniciativa do Conselho Editorial.

Deteção de plágio: todos os artigos submetidos a revista CAB serão previamente analisados por detectores eletrônicos de plágio. Os artigos reprovados serão minuciosamente analisados pela Equipe Editorial e, quando for o caso, informações adicionais serão requisitadas aos autores. Caso o plágio seja confirmado o artigo será sumariamente rejeitado.

Texto: O artigo submetido poderá ser enviado tanto redigido em Inglês quanto em Português. Como a revista CAB adota a publicação bilíngue, os autores deverão ter ciência que será necessário o envio do texto na outra modalidade no caso de aprovação para publicação. Para o texto em português, a revisão linguística será realizada pela equipe editorial do portal de periódicos da UFG.

PREPARAÇÃO DE ORIGINAIS

Autores: os nomes dos autores e a filiação institucional de cada um não devem aparecer no arquivo texto enviado para submissão para, com isso, garantir o critério de sigilo da CAB na avaliação por pares duplo-cego. A CAB alerta que o número de autores por artigo deve ser de, no máximo, 9 (nove).

Número de páginas: sugere-se que o artigo contenha um número máximo de 20 páginas.

Resumo: o texto do artigo deve conter um resumo em inglês e outro em português, de mesmo teor, apresentando clareza e concisão. Exige-se que o resumo tenha no mínimo 180 e, no máximo, 250 palavras. Não serão aceitas traduções automáticas.

Palavras-chave: número mínimo de 3 e no máximo de 5 palavras, separadas por ponto e vírgula. Devem ser apresentadas tanto em Inglês quanto em Português.

Figuras, Gráficos e Tabelas: deverão ser inseridos, obrigatoriamente, no corpo do texto após serem citados. Não inserir no final do texto.

Comitê de Ética: devem ser apresentados o número do protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e/ou Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) no corpo do texto. O certificado de aprovação, obrigatório, deverá ser anexado no ato da submissão do artigo.

URLs: utilizar itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL), todos os endereços de URLs no texto deverão estar ativos (Ex.: <http://www.ibict.br>).

ESTRUTURA DO TEXTO

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

Resumo: Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado, com um mínimo de 180 e máximo de 250 palavras;

Palavras-chave: Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado e no máximo cinco palavras-chave;

Título em inglês (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado; negrito;

Abstract (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado;

Keywords: Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado e no máximo cinco palavras-chave;

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Os tópicos Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos a critério dos autores);

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências (não utilize o termo bibliografia): Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo.

ANEXO

2. FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO

05/06/2019

Projeto: Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Fitoterápicos Veterinários Inovadores com foco na Produção e na Sanidade Aquícola | CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA - PROPPIT
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFOPA - CEUA

FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM
EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO.

Protocolo: 0620190076

Cadastrado em: 05/06/2019 às 11:17:39 - Por:
Gustavo da Silva Claudiano

Finalidade: Pesquisa

Início: 05/08/2019

Término: 05/05/2022

Status do Projeto: CADASTRADO

Título do Projeto: Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Fitoterápicos Veterinários Inovadores com foco na Produção e na Sanidade Aquícola

RESPONSÁVEL (IS)

Professor: Gustavo da Silva Claudiano

E-mail: claudianovet@yahoo.com.br

Outro Professor: Debora Kono Taketa Moreira

Outros nomes: Kelly Christina Ferreira Castro

Telefone: (93) 99145-6575

Experiência prévia do executor: SIM

Treinamento do executor: SIM

Vinculo com a Instituição: Professor/Pesquisador

SOBRE O PROJETO:

Resumo do projeto/Aula:

A aquicultura mundial encontra-se em plena expansão e é uma das principais fontes de proteína de elevado valor biológico nas próximas décadas. Esse cenário impulsiona e culmina na intensificação dos sistemas de produção aquícola, com aumento da incidência e severidade de várias doenças. Os surtos de doenças cada vez mais são reconhecidos como um dos entraves para produção aquícola. Convencionalmente o controle de doenças de peixes tem como principal foco o uso de compostos químicos e antibióticos, causando impactos na saúde animal e pública. Assim o desenvolvimento de formas alternativas na prevenção de doenças é uma das maiores necessidades para o desenvolvimento da piscicultura. Isto vem sendo realizado com o uso de fitoterápicos e suas moléculas ativas isoladas com atividade potencial farmacológico utilizados na clínica animal e humano. Assim o projeto pretende-se avaliar o efeito destas moléculas na modulação do sistema imune inato, dos parâmetros clínicos e na sobrevivência dos tambaquis suplementados durante a aeromonose. A prospecção de suas potencialidades tecnológicas e funcionais é de extrema importância para a produção aquícola sustentável.

Objetivos:

Analisar e isolar moléculas ativas oriundas de fitoterápicos amazônicos com efeitos imune-protetor e de valor zootécnico para tambaquis visando melhorar o desenvolvimento das pisciculturas.

Justificativa:

A piscicultura mundial apresenta notável crescimento, estima-se que o Brasil registre um crescimento de 104% em 2025. Dentre os peixes o segundo mais cultivado no país e primeiro na região Norte é o *Colossoma macropomum*. Apesar dos fatores positivos para a expansão da aquicultura o país tem grandes diferenças regionais no que tange às cadeias de produção aquícolas, alguns em estágios mais avançados de estruturação, enquanto outros menos competitivos. O estado do Pará se enquadra no segundo grupo, todavia tem condições naturais para o desenvolvimento do setor. As questões comerciais levam à intensificação dos sistemas de produção, com aumento da incidência de doenças, sendo as doenças infecciosas de maior significância com altas taxas de mortalidade. Para combater as infecções a utilização de produtos químicos e antibióticos tem aumentado. Entretanto, o uso indiscriminado destes produtos intensifica a seleção de microrganismos resistente e graves problemas ambientais. Nos últimos anos a presença de resíduos de antibióticos nos tecidos de peixes comercializadas constitui-se em grandes barreiras à importação, exportação e no consumo. Desta forma, é necessário buscar possíveis substitutos

aos quimioterápicos. Isto vem sendo realizado com o uso de fitoterápicos e suas moléculas ativas isoladas com atividade potencial farmacológico utilizados na clínica animal e humano. Essas moléculas como aditivos na nutrição animal, possibilitam melhor qualidade da ração e dos produtos de origem animal, além, da melhora no desempenho e da sanidade. Diversas espécies de plantas amazônicas já vêm sendo estudadas por grupos de pesquisas da UFOPA e se apresentam como ricas fontes de flavonóides, alcalóides, fenilpropanoides, compostos cumarínicos, dentre outros. Essas substâncias possuem propriedades ação antioxidante, atividade imunoestimulante, antiviral, antimicrobiana, antiparasitária e de sucesso alternativas ao uso de produtos químicos e antimicrobianos. A escolha de todas essas espécies descrita de ocorrência e de produção na Amazônia visa o desenvolvimento e a valorização da agropecuária regional, com concreta aplicação pelos piscicultores, rentabilidade e a utilização sustentável da floresta. Neste momento, esta proposta visa elucidar dúvidas que surgiram nos projetos supracitados e a produção de princípios ativos com potencial zootécnico e imino-protetor para o desenvolvimento das pisciculturas em plantas amazônicas.

Relevância:

Utilização da biodiversidade amazônicas como fitogênico mostra-se como alternativa viável a substituição de antimicrobianos na piscicultura, principal espécie de peixes de criação intensiva como o tambaqui, *C. macropomum*, principal espécie produzido e consumido na região Norte e a segunda do país

SOBRE O (S) ANIMAL (IS):

Procedência: Biotério

Animal geneticamente modificado: NÃO

Justificativa de Uso:

Necessário dos testes de eficácia das moléculas ativas dos fitoterápicos

TIPO E CARACTERÍSTICAS DO (S) ANIMAL (IS):

Táxon: Peixe

Nome Científico: *Colossoma macropomum*

Nome Vulgar: tambaqui

Linhagem: *Colossoma macropomum*

Idade: juvenil

Peso: 180 g

Sexo: M/F

Quantidade de Machos e Fêmeas: 400

CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO:

Planejamento estatístico / Delineamento experimental:

Será utilizado um distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com parcelas subdivididas, em que cada peixe representará uma parcela experimental. Serão utilizados 18 tanques com 500 litros de capacidade conforme descrito abaixo. Serão constituídos dois grupos experimentais: grupo controle (C) e grupo suplementado com probiótico (GS), com nove repetições cada. As moléculas isoladas serão misturadas em três concentrações por quilo de ração comercial de 1g, 3g e 5g. As rações serão formuladas com base nos dados apresentados no NRC (1993). As rações com probiótico e controle serão fornecidas duas vezes ao dia (às 8h00 e às 16h30) por 90 dias, na proporção de 3 a 6 % da biomassa. Os resultados serão submetidos às análises de variância one way e será feito o teste de normalidade alfa 5% (Kolmogorov – Smirnov; Anderson-Darling; Shapiro-Wilk e Watson). Estabelecida a normalidade dos dados será realizada comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou teste Dunn's (5%). O programa estatístico experimental utilizado será "software R". Os dados de sobrevivência serão analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA).

Os materiais biológicos destes exemplares serão usados em outros projetos?: NÃO

Condições de alojamento e alimentação:

Serão utilizados 466 tambaquis, *Colossoma macropomum* ($40,00 \pm 5,00$ g), adquiridos de piscicultura comercial, de mesma reprodução. Inicialmente, os peixes serão acondicionados em tanque (3000 L), para quarentena. Em seguida serão distribuídos, aleatoriamente, em caixas de fibra (500 L / $n=10$), abastecidas com água corrente de poço artesiano, com vazão de 1L/min. e com aeração suplementar no Laboratório Múltiplos de Produção de Organismos Aquáticos (LAMPO / ICTA / UFOPA).

Local onde será mantido: caixas de fibra (500 L) - **Ambiente de alojamento:** caixas de fibra (500 L)
ICTA

Tipo de cama: água

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS:

Estresse/Dor intencional: NÃO

Grau de Invasividade:

GI1 - Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse

Uso de Fármacos Anestésicos: SIM

Fármaco: benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, Alemanha),

Dose: 100 mg L-1

Via de Administração: solução alcoólica na água

Uso de Relaxante Muscular: NÃO

Uso de Fármacos analgésicos: NÃO

Imobilização Animal: SIM

Tipo de Imobilização Animal:

Físico e químico anestesia (benzocaína)

Condições alimentares (Jejum): NÃO

Restrição Hídrica: NÃO

Cirurgia: SIM

Tipo de Cirurgia: ÚNICA

Quais cirurgias:

Necropsia para coleta dos órgãos

No mesmo ato cirúrgico:

PÓS-OPERATÓRIO

Observação da recuperação: NÃO

Outros cuidados: NÃO

Exposição / Inoculação / Administração: NÃO

Extração de materiais biológicos: SIM

Material Biológico: Tecido e sangue

Quantidade de amostra: 300

Frequência extração: 1

Método de coleta: local do corpo representativo do processo infeccioso a ser investigado

FINALIZAÇÃO

Indução de Morte: SIM

Método de indução de morte:

Aprofundamento do plano anestésico

Substância, dose, via:

com solução de benzocaína (1:20.000), diluída em álcool 98° (0,1 g/mL).

Caso método restrito, justificativa:

Não

Destino dos animais após o experimento:

Laboratório de Morfofisiologia Animal

Forma de descarte da carcaça:

Compostagem

RESUMO DO PROCEDIMENTO

Os extratos serão preparados a partir de diferentes partes de plantas amazônicas, será realizada a extração por diversos métodos e analisados via CCD três sistemas de eluição apolar, polar ácido e polar básico. As bandas serão secas e separadas em uma cuba adicionadas nas placas e analisadas em câmara UV-Vis e reveladas as classes de metabólitos escolhidos, esses extratos serão submetidos às partições líquido-líquido com solventes de crescente polaridade e à fracionamentos clássicos de cromatografia em coluna via úmida. Os extratos também serão submetidos a análises cromatográficas via LC-PDA para a obtenção das substâncias com propriedades imunoprotetoras. Todos os extratos obtidos serão submetidos a verificação da atividade bactericida anti-aeromonas e a ensaios toxicidade oral em tambaquis. Apenas os isolados com baixa toxicidade serão submetidos a fracionamento. As substâncias majoritárias serão purificadas por LC-RP e terão suas estruturas elucidadas através da análise dos dados espectrais e por espectrometria de massas. Após obtenção para teste in vivo utilizará 200 tambaquis: grupo controle (sem isolados) e grupo suplementado com os isolados. Na ração comercial será incorporado os respectivos isolados (concentração determinada em ensaio toxicidade) e suplementados por 30 dias, após será analisado as variáveis zootécnicas, histomorfométrica e microbiota intestinal e bromatológicas dos peixes (MELLO et al. 2013). Para análise da sepse, após suplementação 30 tambaquis serão inoculados com *Aeromonas hydrophila* na cavidade celomática e o grupo C (n=10) serão injetados com salina 0,65%, veículo utilizado para a inoculação da bactéria (Claudiano et al., 2019). Nos tempos de 3, 6 e 12 h após a indução, os tratamentos e o controles (n=10) serão submetidos à coleta de sangue e tecidos. Uma alíquota do sangue total será destinada ao hemograma e quantificação bactéria a outra a separação do soro para determinação do bioquímico sérico (BRITO et al.2015). A outra fração do soro analisará o surto oxidativo, a lítica do soro, a concentração de lisozima, a aglutinação bacteriana e a atividade do sistema complemento (Claudiano et al.2019). Para avaliação dos sinais clínicos e da sobrevivência 80 tambaquis, divididos em dois grupos, um inoculado *A. hydrophila* e o controles, será feita pela observação da sobrevivência dos animais durante 15 dias. Os resultados serão submetidos às análises de variância a 5%.