



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

MAÉVEM SOUSA CAMPOS

ANÁLISE DA EFICÁCIA DA CASCA DO CUPUAÇU
(Theobroma grandiflorum) **SOBRE O CRESCIMENTO DA**
Aeromonas hydrophila e *Staphylococcus aureus*

Santarém, Pará

2019

MAÉVEM SOUSA CAMPOS

ANÁLISE DA EFICÁCIA DA CASCA DO CUPUAÇU
(*Theobroma grandiflorum*) SOBRE O CRESCIMENTO DA
Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus

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

Santarém, Pará

2019

MAÉVEM SOUSA CAMPOS

ANÁLISE DA EFICÁCIA DA CASCA DO CUPUAÇU
(Theobroma grandiflorum) **SOBRE O CRESCIMENTO DA**
Aeromonas hydrophila e Staphylococcus aureus

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

Conceito: 8,4

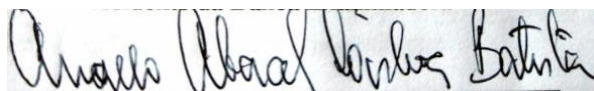
Data de aprovação: 14/12/2019



Dr. Gustavo da Silva Claudiano
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA



Me. Jairo Augusto Sousa Araújo
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA



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

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pois sem Ele esta jornada não seria cumprida de forma alguma.

Aos melhores pais Evaldo Campos e Marlúcia Campos pelo amor, apoio e cuidado. A eles dedico inteiramente este trabalho. AMO MUITO VOCÊS!

A minha vizinha Rita Cavalcante que sempre me encorajou, aconselhou, apoiou em todas as horas, sempre com uma palavra de incentivo e principalmente pelas orações.

Aos meus amigos pelos abraços, carinho e companheirismo em especial à Aline Maia, Ana Maria, Damires Siqueira, Eloise Maia, Iani Corrêa e Luís Maia. VOCÊS SÃO DEMAIS!

Ao meu orientador Gustavo da Silva Claudiano pelo apoio, incentivo, parceria e pelas grandes oportunidades. MUITO OBRIGADA!

A todos os professores do curso de Zootecnia em especial à Alanna Lima pelos conselhos, puxões de orelha e por todo apoio durante os momentos em que mais necessitei.

A toda equipe dos Laboratórios, Microbiologia e PDBio da UFOPA, em especial ao Lucas Alvarenga pelo colaboração e apoio. OBRIGADA!

Aos participantes da banca examinadora por aceitarem o convite e dividirem comigo este momento tão importante e esperado.

A Universidade Federal do Oeste do Pará por me proporcionar um ensino de qualidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho. GRATIDÃO.

Dedico

Primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia,
socorro presente na hora da angústia.
A meu pai Evaldo Campos, a minha mãe Marlúcia e a minha vizinha Rita Cavalcante pela
compreensão, amor e orações.

RESUMO

A demanda mundial por comércio de pescado vem crescendo de forma positiva nas últimas décadas. Devido a este aumento da demanda se faz necessário, a intensificação da produção e ao se fazer isso os peixes ficam mais estressados e em consequência disso, tornam-se mais susceptíveis ao acometimento por patógenos, dentre estes destacam-se as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila*. Assim, o presente trabalho objetivou analisar o efeito do extrato *in vitro* da casca do cupuaçu, *Theobroma grandiflorum*, sobre a capacidade antimicrobiana no crescimento da *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. As cepas utilizadas foram isoladas de peixes naturalmente infectados proveniente de piscicultura comercial. A cepa destas bactérias foram reativadas por cultivo *overnight* em caldo TSB e então cultivada em meio ágar triptona de soja (TSA / Difco®) por 18 horas e suspensas em salina NaCl 0,9% até a concentração 0,5 da escala MacFarland. Foram preparadas e inoculadas com a suspensão de *A. hydrophila* e *S. 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 cloranfenicol (30 µg) utilizado como controle positivo. O ensaio foi feito em 6 repetições cada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, onde posteriormente avaliou-se a formação de halos de inibição ao redor dos discos. De acordo com o resultado obtido, o extrato da casca do cupuaçu não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados negativos podem ter sido influenciados pelo método de extração e quantidade da concentração do extrato em questão. Sendo assim, é necessária a continuidade do estudo sobre a casca do *T. grandiflorum* utilizando outros métodos de extração e em diferentes quantidades, tendo em vista que a mesma possui características com grande potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: extratos vegetais; halo; patologias.

ABSTRACT

World demand for fish trade has been growing positively in recent decades. Due to this increase in demand it is necessary to intensify the production and in doing so the fish become more stressed and as a result become more susceptible to pathogen involvement, among which stand out the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas hydrophila*. Therefore, the use of plant extracts appears as the cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) bark has been studied for these purposes. Thus, the present work aimed to analyze the effect of in vitro extract of the cupuaçu bark (*Theobroma grandiflorum*) on the antimicrobial capacity of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* growth. The strains used were isolated from naturally infected fish from commercial fish farming. The strains of these bacteria were reactivated by overnight cultivation in TSB broth and then cultivated on TSA / Difco® tryptone agar medium for 18 hours and suspended in 0.9% NaCl saline to 0.5 MacFarland concentration. They were prepared and inoculated with the suspension of *A. hydrophila* and *S. 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. This was the negative control and the chloramphenicol antibiotic (30 µg) used as control positive. The test was done in 6 repetitions each. The plates were incubated at 37 ° C for 24 hours, where inhibition halos around the discs were subsequently evaluated. According to the obtained result, the cupuaçu bark extract was not able to inhibit the growth of the bacteria in any of the tested concentrations. The negative results may have been influenced by the extraction method and amount of concentration of the extract in question. Thus, it is necessary to continue the study of the *T. grandiflorum* bark using other extraction methods and in different quantities, considering that it has characteristics with great antimicrobial potential.

Keywords: plant extracts; halo; pathologies

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	11
Obtenção e Preparo do Extrato	11
Obtenção da Bactéria	12
Análise antimicrobiana dos Extratos por Diluição em Placa de Petri	12
Resultados e Discussão.....	13
Conclusão	14
Referências	14
ANEXOS.....	16
1. NORMAS DA REVISTA CIENCIA ANIMAL BRASILEIRA.....	16
2. FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO.....	21

ANÁLISE DA EFICÁCIA DA CASCA DO CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) SOBRE O CRESCIMENTO DA *Aeromonas hydrophila* E *Staphylococcus aureus*

ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF THE CUPUAÇU BARK (*Theobroma grandiflorum*) ON THE GROWTH OF *Aeromonas hydrophila* AND *Staphylococcus aureus*

Resumo

A demanda mundial por comércio de pescado vem crescendo de forma positiva nas últimas décadas. Devido a este aumento da demanda se faz necessário, a intensificação da produção e ao fazer isso, os peixes ficam mais estressados e como consequência tornam-se mais susceptíveis ao acometimento por patógenos, dentre estes se destacam as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila*. Assim, o presente trabalho objetivou analisar o efeito do extrato *in vitro* da casca do cupuaçu, *Theobroma grandiflorum*, sobre a capacidade antimicrobiana no crescimento da *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. As cepas utilizadas foram isoladas de peixes naturalmente infectados proveniente de piscicultura comercial. A cepa destas bactérias foram reativadas por cultivo *overnight* em caldo TSB e então cultivada em meio ágar triptona de soja (TSA / Difco®) por 18 horas e suspensas em salina NaCl 0,9% até a concentração 0,5 da escala MacFarland. Foram preparadas e inoculadas com a suspensão de *A. hydrophila* e *S. 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 cloranfenicol (30 µg) utilizado como controle positivo. O ensaio foi feito em 6 repetições cada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, onde posteriormente avaliou-se a formação de halos de inibição ao redor dos discos. De acordo com o resultado obtido, o extrato da casca do cupuaçu não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados negativos podem ter sido influenciados pelo método de extração e quantidade da concentração do extrato em questão. Sendo assim, é necessária a continuidade do estudo sobre a casca do *T. grandiflorum* utilizando outros métodos de extração e em diferentes quantidades, tendo em vista que a mesma possui características com grande potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: extratos vegetais; halo; patologias

Abstract

World demand for fish trade has been growing positively in recent decades. Due to this increase in demand it is necessary to intensify the production and in doing so the fish become more stressed and as a result become more susceptible to pathogen involvement, among which stand out the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas hydrophila*. Thus, the present work aimed to analyze the effect of *in vitro* extract of the cupuaçu bark, *Theobroma grandiflorum*, on the antimicrobial capacity of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* growth. The strains used were isolated from naturally infected fish from commercial fish farming. The strains of these bacteria were reactivated by overnight cultivation in TSB broth and then cultivated on TSA / Difco® tryptone agar medium for 18 hours and suspended in 0.9% NaCl saline to 0.5 MacFarland concentration. They were prepared and inoculated with the suspension of *A. hydrophila* and *S. 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. This was the negative control and the chloramphenicol antibiotic (30 µg) used as control positive. The test was done in 6 repetitions each. The plates were incubated at 37 ° C for 24 hours, where inhibition halos around the discs were subsequently evaluated. According to the obtained result, the cupuaçu bark extract was not able to inhibit the growth of the bacteria in any of the tested concentrations. The negative results may have been influenced by the extraction method and amount of concentration of the extract in question. Thus, it is necessary to continue the study of the *T. grandiflorum* bark using other extraction methods and in different quantities, considering that it has characteristics with great antimicrobial potential.

Keywords: plant extracts; halo; pathologies

Introdução

A demanda mundial por comércio de pescado vem crescendo nas últimas décadas, principalmente devido o crescimento da população e pela procura dos consumidores por alimentos mais saudáveis. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o pescado já se tornou a proteína animal mais consumido no mundo, além de ser a que traz mais benefício para a saúde. Com o crescimento da demanda torna-se necessário a intensificação da produção ao fazer isso os peixes ficam mais estressados e como consequência tornam-se mais susceptíveis ao acometimento por patógenos, pois sua imunidade encontra-se prejudicada, o que vem a tornar mais fácil a transmissão de doenças nestes animais.

Dentre os patógenos mais frequentes em peixes, destacam-se as bactérias do gênero *Aeromonas* que são bastonetes Gram-negativos, oxidase positivos, anaeróbicos facultativos e estão presentes na superfície e brânquias dos peixes (KOZINSKA, 2007). Enquanto *Staphylococcus* apresenta-se como cocos Gram-positivos, não esporulados, coagulase positivo, oxidase negativo e aeróbico facultativo (JAY, 2005).

Para o controle destas bacterioses os produtores recorrem a produtos químicos. Porém, esses produtos, além do efeito tóxico aos tecidos dos peixes, podem acumular resíduos na musculatura, oferecendo risco potencial ao consumidor, caso não sejam respeitados os tempos de carência pós-tratamento (PÁDUA et al., 2014).

Além disso, causam impacto ambiental no entorno da piscicultura, onde os resíduos dos tratamentos são descartados. Cabe ainda ressaltar que a utilização de produtos químicos deve ser regida por legislação específica e que no Brasil, poucos produtos são registrados para uso em aquicultura (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

Frente a isso, surgem então, os tratamentos alternativos. Os fitoterápicos destacam-se como sendo uma alternativa que caracteriza através da utilização de diferentes partes de plantas na prevenção e controle de patógenos na aquicultura. O interesse é cada vez mais crescente sobre as substâncias oriundas de plantas como alternativas ao uso de antibióticos e produtos químicos no combate a patógenos em piscicultura (CHAGAS, 2004; MADI et al., 2014).

Acredita-se que os extratos vegetais possam causar um desenvolvimento lento de resistência, ser direcionado a espécies-alvo e diminuir largamente a emissão de alguns resíduos (CHAGAS, 2004). Testes *in vitro*, para análise da capacidade antimicrobiana dos extratos são realizados por meio de disco-difusão, onde a difusão do antimicrobiano induz à formação de um halo de inibição de crescimento bacteriano. (SEJAS et al., 2003).

Alguns fitoterápicos efetivos estudados para utilização em piscicultura são extraídos de plantas como é o caso do cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum*, uma planta que vem sendo estudada para estes fins, sua casca pode ser utilizada como adubo orgânico em cultivos agrícolas devido a teores de potássio, ferro, manganês e outros nutrientes. Com o melhor aproveitamento dos subprodutos, considerados resíduos do processo alimentício pode-se agregar mais valor à fruta (HOMMA, 2001).

O presente trabalho objetivou analisar a atividade antimicrobiana do extrato da casca do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) sobre *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*.

Material e Métodos

Obtenção e Preparo do Extrato

As cascas do *Theobroma grandiflorum* foram coletadas no período de Março a Maio de 2019, após coletadas, essas cascas foram levadas para o laboratório de bromatologia (IBEF/UFOPA) para serem secas em estufa de circulação forçada a 45° por 72 horas, até estas estarem indicando a perda de umidade. Após serem retiradas da estufa, foram moídas em moinho de facas do tipo Willey com peneira de 2 mm e armazenada 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 foram pesada 30

gramas do material moído e feito a extração 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 colocado em placas de petri e foram secos com um secador, tendo assim a evaporação do restante do álcool sobrando apenas o extrato concentrado que foi utilizado para preparar a substância teste. Para tanto, 10 mg da amostra foram pesados e diluída em 0,5 ml de água destilada e posteriormente feita a agitação para se obter uma melhor homogeneização do material. O extrato aquoso resultante foi utilizado para a avaliação do potencial antimicrobiano.

Obtenção da Bactéria

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados provenientes 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. Esses fragmentos foram semeados 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 antimicrobiana dos Extratos por Diluição em Placa de Petri

O teste foi realizado no laboratório de microbiologia (ISCO/UFOPA). Para o ensaio do potencial antimicrobiano do extrato de *Theobroma grandiflorum*, a cepa de *Aeromonas*

hydrophila e *Staphylococcus aureus* foram reativadas por cultivo *overnight* em caldo TSB e então cultivada em meio ágar tripton de soja (TSA / Difco®) por 18 horas e suspensas 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). Foram 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 cloranfenicol (30 µg) utilizado como controle positivo. O ensaio foi feito em 6 repetições cada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, onde posteriormente avaliou-se a formação de halos de inibição ao redor dos discos.

Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que as concentrações do extrato da casca do *Theobroma grandiflorum* (10 mg da amostra em 0,5 ml de água destilada) não apresentaram a formação do halo de inibição para *Staphylococcus aureus*. A resistência aos microrganismos Gram-negativos é explicada, pois estes apresentam características estruturais que dificultam a penetração dos antimicrobianos, como é o caso da camada externa de lipopolissacarídeos, que determina propriedades de superfície, tais como permeabilidade e susceptibilidade a antibióticos (YOKOTA; FUJII, 2007).

Silva (2017) avaliou a propriedade antibacteriana do extrato alcoólico da folha amendoeira, obtido pelo método de extração a frio, sobre *Aeromonas hydrophila*, e não observou o aparecimento de halos de inibição. Os mesmos resultados foram observados *A. hydrophila* (KLEIN *et al.*, 2015), onde os resultados para a avaliação da atividade anti-bacteriana mostraram que o extrato de casca de pinhão não observou o aparecimento de halos de inibição para *A. hydrophila*, porém apresentou atividade inibitória contra *S. aureus*. Esses resultados corroboram aos encontrados no presente trabalho, pois observou-se que não houve a formação de halos de inibição utilizando o extrato de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).

Em um estudo realizado por Gonçalves *et al.* (2005), utilizando extratos da casca do tronco da copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e do ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*)

não se observou crescimento de halo de inibição para a bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto nos extratos do tronco de barbatimão (*Stryphnodendron*) e jatobá (*Hymenaea courbaril*) observou-se formação de halos com 14 mm e 16 mm para esta bactéria, enquanto Pinho *et al.* (2012) verificou em seu trabalho, atividade antimicrobiana em relação as folhas do barbatimão.

Araújo (2016), utilizando extrato aquoso e etanólico da casca de romã (*Punica granatum*), observou halos de inibição entre 11,0 - 13,5 mm para a bactéria *Staphylococcus aureus*. Pinho *et al.* (2012), demonstrou em seu estudo que as folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides Cham*) e da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*) não mostraram atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações em mg mL⁻¹ (200:300:400:500) de extrato hidroalcoólicos.

Sousa *et al.* (2017), utilizando os extratos vegetais do quebra pedra (*Phyllanthus niruri*), a base de etanol e metanol na proporção 1:10 (MW), onde não observou formação de halos de inibição para *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 1000 µg.mL⁻¹ e 5000 µg.mL⁻¹. Esses resultados corroboram aos encontrados no presente estudo.

Conclusão

De acordo com o resultado obtido, o extrato da casca do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) não foi capaz de interferir o crescimento da *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* na concentração testada. Os resultados negativos podem ter sido influenciados pelo método de extração e quantidade da concentração do extrato em questão. Sendo assim, é necessária a continuidade do estudo sobre a casca do *T. grandiflorum* utilizando outros métodos de extração e em diferentes quantidades, tendo em vista que a mesma possui características com grande potencial antimicrobiano.

Referências

ARAUJO, J. M. S. Atividade antimicrobiana de extratos da casca de romã (*punica granatum l.*). in: xxv congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, 25., 2016, Sergipe. **Atividade antimicrobiana de extratos da casca de romã (*punica granatum l.*)**. Sergipe: Sbcta, 2016. p. 1 - 5.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas usando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 156-160, 2004.

- 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.**
- 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.
- HOMMA, A. K. O. **O desenvolvimento da agroindústria no estado do Pará.** Saber: ciências exatas e tecnologia, Belém, v. 3, p. 49-73, 2001. Edição especial. II Simpósio nordestino de recursos naturais e potencialidades terapêuticas - II renapte, 2017, Teresina, Piauí. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato da folha de amendoira (terminalia catappa l).** Teresina, Piauí: Rev. Interd. CiÊn. SaÚde, 2017. 1 p. Disponível em: <<https://revistas.ufpi.br/index.php/rics/article/view/6735>>. Acesso em: 03 nov. 2019.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.
- KLEIN *et al.*. **Avaliação da atividade antimicrobiana e alelopática de extrato de casca de pinhão.** 2015.
- KOZINSKA, A. **Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland.** J. Fish Dis., 30, 293-301, 2007.
- MADI, R.R.; CAMPOS, C.M. de; LIZAMA, M. de los A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Patologia e sanidade em ambientes aquáticos.** 1 ed. Massoni, 342 p, 2014.
- PÁDUA, S. B. et al. Parasitological assessment and host-parasite relationship in farmed cachara catfish fingerlings *Pseudoplatystoma reticulatum* (EIGENMANN & EIGENMANN 1889). **Neotropical Helminthology**, v. 8, p. 37-45, 2014.
- PINHO L.; SOUZA P. N. S.; SOBRINHO E. M. S. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v.42, n.2, fev, 2012.
- SEJAS, L. M. et al. **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, 2003.
- SILVA et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato da folha de amendoira (*Terminalia catappa L.*)** 2017
- SOUSA et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato da folha de amendoira (*Terminalia catappa L.*)** 2017
- TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335 - 341, 2009.
- YOKOTA, S; FUJII, N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa*. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v. 30, p. 97-109, 2007.

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.

Dectecção 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, fenilpropanóides, 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 imuno-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%.