



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS - IBEF
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

HORTÊNCIA MIRANDA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN*
VITRO DE EXTRATOS VEGETAIS E GEOPRÓPOLIS DE
Melipona sp. SOBRE *Aeromonas hydrophila* E *Staphylococcus*
*aureus***

**Santarém
2019**

HORTÊNCIA MIRANDA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO*
DE EXTRATOS VEGETAIS E GEOPRÓPOLIS DE *Melipona sp.*
SOBRE *Aeromonas hydrophila* E *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Agrárias para obtenção 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
2019**

HORTÊNCIA MIRANDA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO*
DE EXTRATOS VEGETAIS E GEOPRÓPOLIS DE *Melipona sp.*
SOBRE *Aeromonas hydrophila* E *Staphylococcus aureus***

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

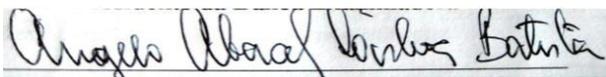
Orientador: Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano.

Conceito: 8,8

Data de Aprovação: 14/12/2019



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



Med. Vet. Esp. Angelo Abaal Lisboa Batista
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA



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

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e todas as bênçãos concedidas.

Aos meus pais Maria Telma e Emídio Bruno por incansavelmente em meio diversas dificuldades incentivarem os filhos a serem cidadãos de bem e sempre visar os estudos como prioridade na vida.

Ao meu orientador professor Gustavo da Silva Claudiano, pelo auxílio na elaboração deste estudo, pelo incentivo e por todas as oportunidades que proporciona a seus orientados.

Ao monitor do Laboratório de Microbiologia Lucas Alvarenga por me ajudar na execução dos testes, pela ajuda na elaboração do trabalho e toda a paciência envolvida.

As minhas “irmãs de orientação” Iani e Vivian que sempre me socorreram nas dificuldades durante o trabalho.

Ao professor Bruno A. da Silva do Laboratório de Farmacognóssia (ISCO/UFOPA) por ceder os extratos utilizados nos testes.

A todos os amigos que direta ou indiretamente me apoiaram nesta caminhada.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e por cederem contribuições para este trabalho.

RESUMO

As doenças infecciosas são responsáveis por alta mortalidade é um problema para saúde pública e animal. Devido a esses problemas, é recorrente na terapêutica dos peixes, o uso de quimioterápicos. Tendo em vista os riscos associados aos métodos de controle sanitário classicamente empregados na criação de peixes, uma alternativa seria o uso de fitoterápicos. Este estudo objetiva avaliar a ação antibacteriana de extratos vegetais frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. Os extratos foram divididos em: A1 (Extrato aquoso aquecido das cascas de *Annona squamosa* 50mg/mL); A2 (Extrato aquoso não aquecido das folhas da *Annona squamosa* 50mg/mL); A3 (Extrato aquecido das folhas de *Annona squamosa* 50mg/mL); B1 (Extrato aquoso aquecido da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); B2 (Extrato hidroetanólico 50% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); B3 (Extrato etanólico 100% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); C1 (Extrato hidroetanólico 50% das folhas da *Pouteria macrophylla* 50 mg/mL); e D1 (Extrato de geoprópolis 50 mg/mL). Os extratos foram testados contra uma bactéria gram positiva *S. aureus* ATCC 14458 e uma gram negativa *A. hydrophila* - isolada de peixes infectados. O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. A determinação da atividade antimicrobiana in vitro seguiu as descrições do protocolo M02-A12 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), utilizando o teste disco-difusão descrito por Kirb e Bauer. O extrato das folhas da *Pouteria macrophylla* 50 mg/mL e o extrato etanólico 100% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL apresentaram inibição ao crescimento da *S. aureus*. Ambos apresentaram halos com medidas de 7mm de diâmetro. Nenhum dos extratos apresentou ação inibitória contra o crescimento de *A. hydrophila*. No entanto essas atividades não demonstraram ação significativa sobre as cepas. Concluiu-se que em maiores concentrações ou com auxílio de outra metodologia, o extrato hidroetanólico da cutite (*Pouteria macrophylla*), e o extrato etanólico do acapu (*Vouacapoua americana*), podem apresentar maior atividade antimicrobiana. São necessários outros estudos e mais aprofundados, como toxicidade, para a utilização comercial dessas espécies na aquicultura.

Palavras-Chave: Piscicultura. Extratos. Antibiógrama.

ABSTRACT

Infectious diseases are responsible for high mortality is a problem for public and animal health. Due to these problems, the use of chemotherapy is recurrent in fish therapy. Given the risks associated with classically used health control methods in fish farming, an alternative would be the use of herbal medicines. This study aims to evaluate the antibacterial action of plant extracts and geopropolis of *Melipona sp.* against *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The extracts were divided into: A1 (Heated aqueous extract of *Annona squamosa* peel 50mg / mL); A2 (Unheated aqueous extract of *Annona squamosa* leaves 50mg / mL); A3 (*Annona squamosa* 50mg / mL heated leaf extract); B1 (heated aqueous extract of *Vouacapoua americana* 65 mg / mL); B2 (50% hydroxyanolic extract of *Vouacapoua americana* 65 mg / mL); B3 (100% *Vouacapoua americana* ethanolic extract 65 mg / mL); C1 (hydroethanolic extract 50% of the leaves of *Pouteria macrophylla* 50 mg / mL); and D1 (Geopropolis Extract 50 mg / mL). The extracts were tested against gram positive bacteria *S. aureus* ATCC 14458 and gram negative *A. hydrophila* - isolated from infected fish. The study was conducted at the Microbiology Laboratory, Federal University of Western Pará - UFOPA. The determination of in vitro antimicrobial activity followed the descriptions of protocol M02-A12 of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) using the disk diffusion test described by Kirb and Bauer. The leaves extract of *Pouteria macrophylla* 50 mg / mL and the 100% ethanol extract of *Vouacapoua americana* 65 mg / mL showed inhibition of *S. aureus* growth. Both had halos measuring 7mm in diameter. None of the extracts showed inhibitory action against growth of *A. hydrophila*. However, these activities did not show significant action on the strains. It was concluded that in higher concentrations or with the aid of another methodology, the hydroethanolic extract of cutite (*Pouteria macrophylla*) and the ethanolic extract of acapu (*Vouacapoua americana*) may have higher antimicrobial activity. Further and further studies, such as toxicity, are required for commercial use of these species in aquaculture.

Keywords: Pisciculture. Extracts. Antibiogram.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nation
IBEF	Instituto de Biodiversidade e Florestas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISCO	Instituto de Saúde Coletiva
ISO	Organização Internacional de Normalização
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio
sp.	Espécie
TSA	Agar Triptona de Soja
TSA	Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana
TSB	Caldo Triptona de Soja
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
WHO	World Health Organization
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
2.1. Obtenção dos extratos	09
2.2 Obtenção da bactéria	09
2.3 Teste da Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	09
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4. CONCLUSÕES.....	11
5. REFERÊNCIAS.....	12
ANEXO 1 - Formulário de solicitação de autorização para uso de animais em experimentação e/ou ensino	14
ANEXO 2 - Normas da revista.....	19

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS E GEOPRÓPOLIS DE *Melipona* sp. SOBRE *Aeromonas hydrophila* E *Staphylococcus aureus*¹

Hortência Miranda Rocha^{2*}; Gustavo da Silva Claudiano³

ABSTRACT.- Rocha, H. M.; Claudiano, G. S. 2019. [Evaluation of bacterial action of plant extracts and geopropolis of *Melipona* sp. against *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*]. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos vegetais e geoprópolis de *Melipona* sp. sobre *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Brazil. *hortencia_thek@hotmail.com.

This study aims to evaluate the antibacterial action of plant extracts against *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The extracts were divided into: A1 (Heated aqueous extract of *Annona squamosa* peel 50mg / mL); A2 (Unheated aqueous extract of *Annona squamosa* leaves 50mg / mL); A3 (*Annona squamosa* 50mg / mL heated leaf extract); B1 (heated aqueous extract of *Vouacapoua americana* 65 mg / mL); B2 (50% hydroxyanolic extract of *Vouacapoua americana* 65 mg / mL); B3 (100% *Vouacapoua americana* ethanolic extract 65 mg / mL); C1 (Hydroethanolic extract 50% of the leaves of *Pouteria macrophylla* 50 mg / mL); and D1 (Geopropolis Extract 50 mg / mL). The extracts were tested against gram positive bacteria *S. aureus* ATCC 14458 and gram negative *A. hydrophila* - isolated from infected fish. The study was conducted at the Microbiology Laboratory, Federal University of Western Pará - UFOPA. The determination of *in vitro* antimicrobial activity followed the descriptions of protocol M02-A12 of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) using the disk diffusion test described by Kirb and Bauer. The leaves extract of *Pouteria macrophylla* 50 mg / mL and the 100% ethanol extract of *Vouacapoua americana* 65 mg / mL showed inhibition of *S. aureus* growth. Both had halos measuring 7mm in diameter. None of the extracts showed inhibitory action against growth of *A. hydrophila*. However, these activities did not show significant action on the strains. It was concluded that in higher concentrations or with the aid of another methodology, the hydroethanolic extract of cutite (*Pouteria macrophylla*) and the ethanolic extract of acapu (*Vouacapoua americana*) may have higher antimicrobial activity. Further and further studies, such as toxicity, are required for commercial use of these species in aquaculture.

INDEX TERMS: Pisciculture, Extracts, Antibiogram.

¹ Trabalho apresentado à Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Agrárias, em Santarém, 14 de Dezembro de 2019.

² Graduanda em Bacharelado Interdisciplinar em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA.*hortencia_thek@hotmail.com.

³ Orientador, docente adjunto da Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA. claudianovet@yahoo.com.br.

RESUMO.- Este estudo objetiva avaliar a ação antibacteriana de extratos vegetais frente às bactérias *A. hydrophila* e *S. aureus*. Os extratos foram identificados como: A1 (Extrato aquoso aquecido das cascas de *Annona squamosa* 50mg/mL); A2 (Extrato aquoso não aquecido das folhas da *Annona squamosa* 50mg/mL); A3 (Extrato aquecido das folhas de *Annona squamosa* 50mg/mL); B1 (Extrato aquoso aquecido da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); B2 (Extrato hidroetanólico 50% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); B3 (Extrato etanólico 100% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); C1 (Extrato hidroetanólico 50% das folhas da *Pouteria macrophylla* 50 mg/mL); e D1 (Extrato de geoprópolis 50 mg/mL). Os extratos foram testados contra uma bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e uma gram negativa *Aeromonas hydrophila* - isolada de peixes infectados. O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA. A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* seguiu as descrições do protocolo M100-S25 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, utilizando o teste disco-difusão descrito por Kirb e Bauer. O extrato das folhas da *Pouteria macrophylla* 50 mg/mL e o extrato etanólico 100% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL apresentaram inibição ao crescimento da *S. aureus*. Ambos apresentaram halos com medidas de 7mm de diâmetro. Nenhum dos extratos apresentou ação inibitória contra o crescimento de *A. hydrophila*. Concluiu-se que em maiores concentrações ou com auxílio de outra metodologia, o extrato hidroetanólico da cutite (*Pouteria macrophylla*), e o extrato etanólico do acapu (*Vouacapoua americana*), podem apresentar maior atividade antimicrobiana. São necessários outros e mais aprofundados estudos, como toxicidade, para a utilização comercial dessas espécies na aquicultura.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Piscicultura, extratos, antibiograma.

INTRODUÇÃO

A piscicultura é um segmento da aquicultura que tem tido grande aceleração no seu crescimento e encontra-se em plena expansão. Juntamente com o crescimento populacional, a busca por fontes saudáveis de alimentação influenciou o aumento do consumo mundial da carne de peixes (FAO 2018). A piscicultura nacional tem acompanhado esse crescimento, atingindo produção de 485, 2 mil toneladas em 2017 (IBGE 2017). Junto a intensificação, surgem problemas relacionados a alta densidade como estresse animal e o uso indiscriminado de fármacos. Esses entraves contribuem para a proliferação e o desenvolvimento de parasitas e microrganismos patogênicos na criação. Muitas das doenças que causam prejuízos são provocadas por agentes infecciosos e podem tornar a atividade pouco lucrativa para os piscicultores, devido as altas taxas de mortalidade (Tavechio et al. 2009).

Devido a esses problemas, é recorrente na terapêutica dos peixes, o uso de quimioterápicos como fungicidas, antiparasitários e antimicrobianos, os quais possuem substâncias tóxicas que liberam substâncias ativas na água e nos órgãos dos animais (Kinkelin et al. 1992 apud Claudiano et al. 2012). Além disso, o acúmulo desses resíduos na musculatura, oferece risco potencial ao consumidor, caso sejam ignorados e não sejam respeitados os tempos de carência pós-tratamento (Tavechio et al. 2009).

O manejo inadequado de produtos alopatícos na aquicultura favorece a seleção de bactérias resistentes aos tratamentos. A Organização Mundial da Saúde (WHO 2013), relata que a resistência aos antibióticos é uma das maiores ameaças globais a saúde, devido a registros de mortes humanas por infecções causadas por bactérias multirresistentes e da dificuldade de introdução de novos antibióticos no mercado. Por isso, próbióticos, prebióticos e extratos de plantas vêm sendo utilizados como imunoestimulantes, pois favorecem o aumento da atividade de células fagocitárias, a produção de lisossomos e anticorpos, diminuem o estresse do manejo e reduzem perdas causadas por doenças (Chitmanat 2002 apud Tavechio et al. 2009).

A fitoterapia é caracterizada pelo uso de diferentes partes de plantas na prevenção e controle de doenças (Tavechio et al., 2009). Além de ser associada diminuição de custos e de perdas na criação, busca atender um mercado consumidor cada vez mais exigente quanto ao modo de criação dos animais e quanto à qualidade do produto final (Royer et al. 2013).

Tendo em vista os riscos associados aos métodos de controle sanitário classicamente empregados na criação de peixes, uma alternativa seria o uso de fitoterápicos. Ao contrário dos produtos químicos e fármacos sintéticos, os extratos vegetais podem causar um desenvolvimento lento de resistência, ser direcionados a espécies-alvo, ser facilmente biodegradáveis e por isso, diminuir amplamente a emissão de resíduos ao ambiente (Chagas 2004).

Os vegetais possuem vias metabólicas secundárias que podem apresentar atividade de defesa contra predadores naturais como fungos, nematoides, vírus e bactérias (Silveira et al. 2009), e estimular o sistema imune através de óleos essenciais e extratos brutos. Estes pode ser obtidos pela retirada dos princípios ativos de matérias-primas vegetais secas, tratadas ou não, previamente e preparadas por processos que envolvem a utilização de solventes como por exemplo, a água ou o e extraídos por métodos como maceração, percolação, infusão, decocção, extração em aparelho de Soxhlet e destilação por arraste a vapor, entre outros (Oliveira et al. 2016). Conforme Tavechio et al. (2009), esses princípios ativos de extratos disponíveis devem ser estudados e testados para conhecimento de seus diversos efeitos, como compreender seu potencial imunoestimulante, fitoterápico, e na prevenção e controle de patógenos.

As folhas de *Annona squamosa*, popularmente chamada de pinha, araticum, anona, ata, fruta-do-conde ou língua-de-tucano, são utilizadas popularmente no tratamento de furúnculos, aftas e úlceras e tem sido estudada pela presença de vários tipos de metabólicos secundários em suas folhas e cascas (Souza 2012).

Cascas e folhas de acapu (*Vouacapoua americana*), tem feito parte de estudos para verificação do potencial alopatíco sobre o crescimento de outras plantas (Souza Filho & Alves 2000), por sua madeira possuir boa resistência natural a deterioração e a diversos organismos, tem sido estudado o seu potencial fitotóxico e fungitóxico (Paracampo et al. 2009).

Outra espécie utilizada em pesquisas científicas é a *Pouteria macrophylla* (Sapotaceae), também conhecida por cutite ou cutiribá (Brasil 2015). Silveira et al. (2008), e Silva (2011), relataram que a presença de alguns compostos como alcaloides e flavonoides no metabolismo secundário das plantas do gênero *Pouteria*, demonstram atividades biológicas como antimicrobiana, antiinflamatória, antiespasmódica e analgésica.

Há também um crescente interesse nas atividades biológicas dos produtos naturais como a própolis, produzida pelas abelhas, e sua ação antimicrobiana (Lima 2015). A geoprópolis é produzida pelas espécies de abelhas sem ferrão, que coletam material resinoso das plantas e misturam com cera e barro ou terra (Kerr 1987). Estudos demonstram as atividades antioxidante, antifúngica e antimicrobiana dos extratos da geoprópolis brasileira (Souza 2016).

O teste antimicrobiano (TSA – Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana), é utilizado afim de determinar a sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a um agente antimicrobiano (Humphrey & Lightbowm 1952, apud Buller et al. 2014). Os resultados influenciarão diretamente na escolha da terapêutica antimicrobiana.

Existe uma escassez de estudos científicos na literatura que relatem a utilização dos extratos das referidas plantas como agente antimicrobiano. O presente estudo objetiva avaliar a ação antibacteriana do extrato da *Pouteria macrophylla*, extrato das folhas da *Annona squamosa*, extrato da casca de *Annona squamosa*, extrato aquoso, hidroetanólico e etanólico de *Vouacapoua americana* e extrato de geoprópolis frente às bactérias *A. hydrophila* e *S. aureus*, através da técnica de difusão em ágar.

MATERIAL MÉTODOS

Para verificar a resistência antimicrobiana foram utilizados os seguintes extratos e concentrações: extratos aquecido e não aquecido das folhas de *Annona squamosa* (50mg/mL); extrato da casca de *Annona squamosa* (50mg/mL); extrato aquoso, hidroetanólico e etanólico de *Vouacapoua americana* (65mg/mL); extrato hidroetanólico das folhas da cutite (*Pouteria macrophylla*) 50mg/mL; e extrato de geoprópolis 50 mg/mL.

Obtenção dos extratos. Os extratos foram cedidos pelo Laboratório de Farmacognóssia da Universidade federal do Oeste do Pará – UFOPA, e tiveram as seguintes formas de extração:

Para o preparo do extrato aquoso aquecido das cascas de *Annona squamosa* (50mg/mL), 5g das cascas secas trituradas foram dissolvidas em 100 mL de água destilada e aquecidas a 65° C por 60 minutos. Já o preparo do extrato aquoso não aquecido das folhas da *Annona squamosa* 50mg/mL consistiu em 5g de folhas secas trituradas dissolvidas em 100 mL de água destilada e a mistura foi agitada da 5 em 5 até completar 60 minutos em agitador tipo vortex. Para o extrato aquecido das folhas da mesma planta, 5g de folhas secas trituradas foram dissolvidas em 100 mL de água destilada e a mistura foi levada ao aquecimento na temperatura de 65 ° C por 60 minutos.

Para obtenção do extrato aquoso aquecido das cascas da *Vouacapoua americana* (65 mg/mL), 5g de cascas secas trituradas foram dissolvidas em 100 mL de água destilada e a mistura foi agitada da 5 em 5 até completar 60 minutos em agitador tipo vortex.

O extrato hidroetanólico 50% da *Vouacapoua americana* (65 mg/mL), foi obtido ao se dissolver 5g das cascas secas trituradas, em 100 mL de uma solução hidroetanólica 50% (50 mL de água destilada + 50 mL de etanol) e a mistura agitada de 5 em 5 até completar 60 minutos em agitador tipo vortex.

Dissolveu-se 5g de casca secas trituradas, em 100 mL de etanol P. A., para obter o extrato etanólico 100% da *Vouacapoua americana* (65 mg/mL). Após isso, a mistura foi agitada da 5 em 5 até completar 60 minutos em agitador tipo vortex.

Para o extrato hidroetanólico 50% da *Pouteria macrophylla* 50 mg/mL, 5g de folhas secas trituradas foram dissolvidas em 100 mL de uma solução hidroetanólica 50% (50 mL de água destilada + 50 mL de etanol) e a mistura foi agitada da 5 em 5 até completar 60 minutos em agitador tipo vortex.

Já na obtenção do extrato da geoprópolis, 5g de geoprópolis de *Melipona sp.* foi triturada e submetida a extração em aparelho de soxhlet com 150 mL de etanol P A. como solvente extrator na temperatura de 80° C sob refluxo por 2 horas. O extrato foi posteriormente concentrado por evaporação sob pressão reduzida e o volume final foi aferido para 100 mL.

Obtenção das bactérias. Os extratos foram testados contra uma bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e uma gram negativa *Aeromonas hydrophila* - isolada de peixes infectados, provenientes de piscicultura comercial.

Para o isolamento da cepa de *Aeromonas hydrophila*, peixes foram coletados e levados ao Laboratório de Sanidade Animal (LARSANA), IBEF/UFOPA, onde foram eutanaseados 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).

Para a cultura bacteriológica foram colhidos assepticamente fragmentos de encéfalo, rim, fígado e baço, sendo em seguida semeados em placas de Petri contendo ágar triptona de soja (TSA / Difco®) acrescido com ampicilina (10 mg/L) e incubados por 24 h, a 30 °C. As colônias suspeitas foram identificadas por suas características morfológicas e tintoriais, seguida de métodos bioquímicos e pelo “kit Bactray 3”, e após esse processo foram armazenadas em caldo TSB suplementado com glicerol a -80° C.

Teste da Atividade antimicrobiana *in vitro*. Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia, da Universidade federal do Oeste do Pará – UFOPA.

As linhagens bacterianas utilizadas, foram crescidas em meio Ágar Triptona de Soja (TSA / Difco®) a 37°C por 18 horas, em seguida colônias isoladas foram coletadas com o auxílio de alça de platina e coladas em solução salina NaCl (0,9%) até que fosse alcançado a turbidez correspondente a 0,5 na escala MacFarland.

A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* seguiu as descrições do protocolo M02-A12 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), utilizando o teste disco-difusão descrito por Kirb e Bauer em 1966. Para isso, as suspensões bacterianas confeccionadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Mueller-Hinton (DIFCO®), e então, discos de papel de 6 mm impregnados com 10 µl de cada extrato foram colocados sobre a placa, juntamente de discos comerciais do antibiótico Cloranfenicol 30µg/mL (controle positivo) e discos secos (controle negativo), sendo testado, em cada placa, dois extratos em triplicata. Os discos foram

identificados como: A1 (Extrato aquoso aquecido das cascas de *Annona squamosa* 50mg/mL); A2 (Extrato aquoso não aquecido das folhas da *Annona squamosa* 50mg/mL); A3 (Extrato aquecido das folhas de *Annona squamosa* 50mg/mL); B1 (Extrato aquoso aquecido da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); B2 (Extrato hidroetanólico 50% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); B3 (Extrato etanólico 100% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL); C1 (Extrato hidroetanólico 50% das folhas da *Pouteria macrophylla* 50 mg/mL); e D1 (Extrato de geoprópolis 50 mg/mL). Após os discos serem posicionados, as placas foram invertidas e incubadas em estufa bacteriológica (ethik-ethiktechnology) a 37 °C por 24 horas, e após esse período foram analisadas individualmente para a leitura, sendo observado a formação e o tamanho dos halos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes com a *S. aureus* o extrato das folhas da *Pouteria macrophylla* 50 mg/mL e o extrato etanólico 100% da *Vouacapoua americana* 65 mg/mL apresentaram inibição ao crescimento bacteriano. Ambos apresentaram halos com medidas de 7mm de diâmetro (Quadro 1). Entretanto, não houve formação de halos de inibição para ambas as espécies com os demais extratos, possivelmente pela concentrações empregadas ou os métodos de extração utilizados no presente estudo.

Quadro 1. Diâmetros médios dos halos de inibição formados com o uso de extratos vegetais frente a *S. aureus* e *A. hydrophila*.

Extrato Testado	Diâmetro médio dos halos (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>A. hydrophila</i>
A1 (Extrato aquoso aquecido das cascas de <i>A. squamosa</i> 50mg/mL);	-	-
A2 (Extrato aquoso não aquecido das folhas da <i>A. squamosa</i> 50mg/mL);	-	-
A3 (Extrato aquecido das folhas de <i>A. squamosa</i> 50mg/m)	-	-
B1 (Extrato aquoso aquecido da <i>V. americana</i> 65 mg/mL);	-	-
B2 (Extrato hidroetanólico 50% da <i>V. americana</i> 65 mg/mL);	-	-
B3 (Extrato etanólico 100% da <i>V. americana</i> 65 mg/mL);	7±0	-
C1 (Extrato hidroetanólico 50% das folhas da <i>P. macrophylla</i> 50 mg/mL);	7±0	-
D1(Extrato de geoprópolis 50 mg/mL).	-	-
Clorafenicol®	44±0	41±0

- sem atividade antimicrobiana

Santos et al. (2015), descreveram o potencial antimicrobiano do extrato etanólico das folhas e das cascas do caule de diferentes plantas do gênero *Pouteria*, com atividade antibacteriana (halos de inibição entre 9 e 17mm) frente algumas espécies bacterianas inclusive linhagens de *S. aureus*, corroborando com este estudo. Em outro estudo verificou-se formação de halo com o extrato etanólico de *Pouteria macahensis* frente a bactéria gram positiva *Streptococcus mutans*. A ação foi atribuída à presença de metabólitos secundários como taninos, flavonoides, terpenoides nas espécies do gênero *Pouteria* (Santos 2017).

Avaliando a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólico e alcoólico (folhas e caules da *Eugenia uniflora* L.), frente a cepas gram positivas, Mendonça et al. (2016) também relataram a potencialidade dos extratos hidroetanólico de folhas e cascas de plantas em relação aos aquosos em teste com *S. aureus*. Os autores obtiveram resultados positivos para *S. aureus*, relatando a formação de halos com diâmetros variados entre 8 e 17mm para tratamentos com álcool 70%, nas concentrações 12,5 a 100%. No mesmo estudo os autores relataram que nos tratamentos do extrato que continha álcool absoluto, observou-se a formação de halos nas concentrações 100% (8-12mm) e 50% (8mm).

Bona et al. (2014), também obtiveram resultados semelhantes a este estudo, onde as atividades inibitórias dos extratos aquosos foram menores do que os obtidos para os extratos etanólicos mesmo utilizando diferentes técnicas de extração. Sendo assim, no presente estudo, as formas de diluição dos extratos podem ter influenciado na disponibilidade dos distintos metabólitos dos extrativos utilizados, acarretando em melhor resultado nos tratamentos com diluição alcoólica.

Assim como neste estudo, ao utilizar o extrato etanólico bruto das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.), Carvalho et al. (2014), observaram a inibição através de pequenos halos de inibição nos discos contendo o extrato (d = 8 mm), diluído 1:1 (d = 7 mm) e diluído 1:2 (d = 5 mm) frente à *Staphylococcus aureus*.

Porém, na técnica de diluição em caldo, houve crescimento desta bactéria em todas as diluições do mesmo extrato, demonstrando que o mesmo não apresenta um efeito bacteriostático sobre *S. aureus*, e que o diâmetro de 8 mm não foi significativo. Além disso, esse relato evidencia que além das características físico-químicas do extrato e da forma de extração, o resultados podem depender também da técnica de suscetibilidade escolhida.

Por não haver um padrão de diâmetro mínimo para que um extrato seja considerado eficiente ou não, na maioria dos estudos a zona de inibição é comparada com halos obtidos para antibióticos (Gaspar et al. 2017). O CLSI (2019) estabelece para o teste disco-difusão contra *S. aureus*, que halos de inibição ≤ 12 (clorafenicol 30 ug/mL) indicam a resistência da cepa bacteriana, sendo que neste estudo os halos apresentaram média de 7 mm de diâmetro. Tendo como base o estudo com extrativos vegetais de Araújo et al. (2015), foi interpretado como resistentes ao extrato, as cepas cujo os halos estavam abaixo de 9 mm de diâmetro.

Alguns trabalhos na literatura chamam a atenção ao perfil de resistência exercido pelas bactérias do gênero *Aeromonas*. Suhel et al. (2011), evidenciam o comportamento de resistência cepas de *Aeromonas hydrophila* isoladas das amostras de água, superfície e rim dos peixes a variados antibióticos comerciais. Neste ensaio os fenômenos de resistência também foram observados nas concentrações testadas.

Utilizando extratos com diferentes métodos de extração e diluição e de diferentes partes da *Andira retusa*, Santos (2012), verificou que todos os extratos apresentaram baixa atividade ou nenhuma sobre o crescimento da *A. hydrophila*, corroborando com os resultados do presente estudo. O que pode ser uma justificativa para a ausência de qualquer halo de inibição com todos os tratamentos.

Utilizando extratos etanólicos de própolis sobre 15 isolados de *Aeromonas*, (Andrade et al. 2012), obteve resultados diferentes deste estudo, onde todos foram sensíveis aos extratos (diferidos apenas pelo local de coleta). Esses estudos apontam que a eficácia do extrato pode estar relacionada sobretudo as características dos compostos dos vegetais.

Patel & Rao (2012), avaliando o extrato metanólico da *Mimusops elengi* (Sapotaceae) em estágios diferentes de crescimento, pela técnica de difusão em ágar (poço), observaram atividade contra a cepas gram negativa, como a *S. typhi*. Contrariando os dados obtidos no presente estudo, os autores relatam que as espécies da família Sapotácea são promissoras contra cepas Gram negativas.

Diversos estudos apontam resultados semelhantes a este quanto aos efeitos frente a bactéria Gram positivas (*S. aureus*) e ausência de atividade frente às bactérias Gram negativas. Araújo et al. (2015) avaliando a atividade antibacteriana de extratos vegetais, frente aos dois grupos de bactérias, confirmaram os resultados deste trabalho sobre maior sensibilidade de *S. aureus* aos extratos vegetais, e nenhuma atividade sobre a bactéria Gram negativa utilizada.

Para Santos (2015), a ausência ou redução da ação bactericida em amostras vegetais frente às bactérias Gram negativas ocorre devido as características da composição dos extratos, agindo sobre o sítio de ação dos microrganismos, ou seja, estão relacionados, principalmente, com a desintegração da membrana citoplasmática. Este fator torna os microrganismos Gram negativos mais resistentes decorrente da sua dupla membrana que forma um envelope complexo. Segundo Bylka et al. (2004) a camada de peptidoglicano na parede celular das bactérias Gram positivas é mais espessa, enquanto que nas Gram negativas é mais fina. Além disso, as Gram negativas apresentam duas membranas, sendo uma delas externa ao peptidoglicano. Estas diferenças estruturais resultam em diferentes susceptibilidades a uma variedade de antimicrobianos que tem as estruturas de contorno celular como sítios de ação.

Cowan (1999) apud Silva (2011), descreveu a presença de diversos compostos fenólicos e em altas quantidades no fruto do cutite (*Pouteria macrophylla*), como o ácido gálico. Souza Filho & Alves (2000), identificaram taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides e triterpenoides nas cascas e folhas do acapu (*Vouacapoua americana*). Silva (2010), associa esses metabolitos á ações como privação de substrato, perturbação e desintegração da membrana. Sendo assim, a concentração dos extratos utilizadas pode ter sido um limitante para a baixa atividade antimicrobiana nos testes.

A efetividade dos extratos sobre o crescimento da bactéria vai depender da concentração das substancias antimicrobianas presentes no extrato, e da disponibilidade dos mesmo após a extração.

A ausência de atividade antimicrobiana dos extratos sobre a *S. aureus* e *A. hydrophila* pode ter sido influenciada por diversos fatores como a concentração dos extratos, os métodos de extração e solventes utilizados, a parte das plantas utilizadas, a técnica antimicrobiana utilizada, o período em que os extratos ficaram armazenados, e a resistência das bactérias as substancias presentes.

Não foram encontrados na literatura, estudos voltados ao potencial antimicrobiano com o extrato da *V. americana*. Já no caso da *P. macrophylla* alguns estudos testam sua eficácia, no entanto, estes são voltados ao gênero do qual a espécie faz parte. Sendo assim, utilizou-se trabalhos semelhantes como base discursiva para este.

CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam que nenhuma das amostras analisadas demonstrou efeito antagonista frente a *A. hydrophila*. Entretanto, o extrato hidroetanólico 50% da cutite (*Pouteria macrophylla*), e o extrato etanólico do acapu (*Vouacapoua americana*), apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

Dessa forma, o presente estudo enfatiza a importância da elaboração pesquisas futuras com os extrativos

utilizados em outras concentrações, com variações nas metodologias de extração e testes de toxicidade com as espécies utilizadas para a verificação da viabilidade de uso na aquicultura.

REFERÊNCIAS

- Andrade N.P.C., Da Silva E.M.S., Mota R.A., Veschi J.L.A., Ribeiro M.F., Krewer C.C., & Da Costa M.M., 2012. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.79, n.1, p.9-15
- Araújo E. R., Oliveira D. C., Soares T. C., Langassner S. M., & Tavares J. C. 2015. Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente à bactérias gram negativa e gram positiva. Biota Amazônia. Macapá, v. 5, n. 3, p. 66-71.
- Bona E. A., Pinto F. G., Fruet T. K. Jorge T. C., & De Moura A. C. 2014. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225.
- Brasil 2015. Alimentos Regionais Brasileiros. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção a Saúde Básica. – 2. ed. – Brasília. p. 52.
- Buller N., Thomas A., Barton M. 2014. Antimicrobial Susceptibility Testing. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures.
- Bylka, W.; Matlawska, I.; Pilewski, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. Jana, v. 7, n. 2, p. 24 - 31, 2004.
- Carvalho A.F. Silva D.M., Silva T.R.C., Scarcelli E., & Manhani M.R. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólicos e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). Instituto Biológico - Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.3, p.521-526
- Chagas A. S. 2004. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Rio de Janeiro, 13(1): 156-160.
- Claudiano G. S, Pilarsk F., Cruz C. 2012. Avaliação da concentração letal CL 50% (CL (I) (50-96h)) do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em guarus (*Phalloceros caudimaculatus*). Archives of Veterinary Science. v.17, n.3, p.15-19.
- CLSI. Clinical and Laboratory Institute 2015. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. 20^a Ed. M02-A12. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 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.
- FAO 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. Roma, 2018. Disponível em <<http://www.fao.org>. Acesso em 11 fev. 2019.
- Gaspar, E. B.; Minho, A. P.; Domingues, R.; & Silva, K. C. 2017. Comparação de Métodos para a Avaliação “in Vitro” de Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 40. Embrapa Pecuária Sul. Bagé.
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2017. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, v. 45, p.1-8, 2017. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>>. Acesso em 11 de Fev. de 2019.
- Kerr, W. 1987. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. Inf Agropec 13: 15-27.
- Lima M. V. 2015. Geoprópolis produzidas por diferentes espécies de abelhas: atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos. UFPA. Belém. p. 20-22.
- Mendonça A. T., Carvalho A. R., Ferreira M. C., Resende Júnior M. C. 2016. A utilização dos Extratos hidroalcoólico e alcoólico de *Eugenia Uniflora* L. como agente antibacteriano. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v. 14, n. 1, p. 826-833.
- Oliveira V. B., Zucheto M., Oliveira C. F., Paula C. S., Miguel M. D., & Miguel O. G. 2016. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.) Hook, dicksoniaceae. Ver. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.230-239.
- Paracampo N. E., Muller A. H., Alves S. M., Souza Filho A. P., Guilhon G. M., Arruda, M. S., & Santos L. S., Arruda A. C. 2009. Atividade fitotóxica e fungitóxica de extratos de *Vouacapoua americana Aublet* (Le.-Caesalp.), essência florestal nativa da Amazônia. Ver. Ciênc. Agrár., Belém, n. 32, p. 9-22.
- Patel P., Rao T. V. R. 2012. Screening of antibacterial activity of some undertilized fruits of Sapotaceae. Internacional Food Research Journal. 19(3); 1227-1231
- Royer, A. F. B., Garcia, R. G., Borille, R., Santana, M. R., & Nunes, K. C. 2013. Fitoterapia aplicada à avicultura industrial. Enciclopédia Biosfera, v. 9, n. 17, p. 1466-1484.
- Santos R.F.E.P., Silva I.S.M., Veríssimo R.C.S.S., Lúcio I.M.L., Campesatto E.A., Conserva L.M., Bastos M.L.A. 2015. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae) Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.3, p.367-373.
- Santos R. R. 2017. Constituintes químicos isolados das folhas de *Pouteria macahensis* T. D. Penn (sapotaceae). Ilheus. Universidade Estadual de Santa Cruz. 126p.

- Santos V. N. 2012. Estudo fitoquímico e bioatividade de extratos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth. Dissertação Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM. 171 f
- Silva A. B. 2011. Caracterização físico-química e capacidade antioxidante dos frutos do Cutite (*Pouteria macrophylla*) [(Lam.) Eyma]. UFPA. Belém. 102 p.
- Silva N. C. 2010. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. Universidade Estadual Paulista Botucatu, SP.
- Silveira, D.; Simeoni, L. A.; Silva, C. A. M. 2008. Gênero *Pouteria*: química e atividade biológica. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 19 (2A), p. 501–509
- Silveira L. M., Olea R. S., Mesquita J. S. et al. 2009. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques. Rev. Bras. Farm., 90(2): 124-128.
- Souza, A. S. 2016. Estudo químico, atividade antinociceptiva, atividade antifúngica e potencial antioxidante da geoprópolis produzida pela jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke). Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- Souza Filho, A. P. S; Alves, S. M. 2000. Potencial alelopático de plantas de acapu (*Vouacapoua americana*): Efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. Planta Daninha, v.18, n.3, p.435-441, Viçosa- MG.
- Souza I. V. 2012. Efeito do desbaste de frutos na produção e comercialização da pinha (*Annona squamosa* L.). Magistra, Cruz das Almas, v. 24, n.2, p. 89-88.
- Suhet M. I., Schocken-Iturrino R. P., Amaral L. A. 2011. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de Tilápias do nilo (*oreochromis niloticus*) Ars. Veterinaria, Jaboticabal, SP, v.27, n.1, 036-044.
- Tavechio W. L., 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.
- WHO (World Health Organization) 2013. Anti-microbial resistance. Disponível em <<http://www.who.int/trade/glossary/story004/en/>> Acesso em 13 abr. 2013

ANEXO 1

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	

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

1/9

05/06/2019

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

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

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

2/9

05/06/2019

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

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 descritas 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

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

3/9

05/06/2019

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

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

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

4/9

05/06/2019

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

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

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

5/9

05/06/2019

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

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: benzocaina (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 (benzocaina)

Condições alimentares (Jejum): NÃO

Restrição Hídrica: NÃO

Cirurgia: SIM

Tipo de Cirurgia: ÚNICA

Quais cirurgias:

Necropsia para coleta dos órgãos

No mesmo ato cirúrgico:

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

6/9

05/06/2019

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

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

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

7/9

05/06/2019

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

FINALIZAÇÃO**Indução de Morte:** SIM**Método de indução de morte:**

Aprofundamento do plano anestésico

Substância, dose, via:

com solução de benzocaina (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

www.ufopa.edu.br/ceua/painel/projetos/76

8/9

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 (Claudio 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 bacteriana 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 (Claudio 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%.

ANEXO 2

Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira



ISSN 0100-736X versão impressa
ISSN 1678-5150 versão online

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Objetivo e política editorial](#)

Política editorial

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são avaliados pelos pares (peer review) e, aceitos para publicação, com dois pareceres favoráveis ou rejeitados, por dois pareceres desfavoráveis.

Os direitos autorais dos artigos aceitos para publicação permanecem com os autores.

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da comunicação de aceite, ao autor para correspondência. Não há taxa de submissão e avaliação de artigo.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

- o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.
- o **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**
- o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de "INDEX TERMS" que incluem palavras do título;
- o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos "TERMOS DE INDEXAÇÃO" que incluem palavras do título;
- o **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;
- em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;
- em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;
- na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
- as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;
- Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;
- a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

- A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do "Inserir nota de fim", do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois artigos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"**; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto). 5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Revista Pesquisa Veterinária Brasileira
Caixa Postal 74.591
23890-000, Seropédica
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Tel./fax: +55 (21) 2682-1081