

Rendimento, caracterização fitoquímica e avaliação de atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de *Ilex brevicuspis* Reissek (Aquifoliaceae) frente a sorotipos de *Salmonella* spp de origem avícola

Yield, phytochemical characterization and evaluation of antibacterial and antioxidante activity of *Ilex brevicuspis* (Aquifoliaceae) Reissek extracts against *Salmonella* spp serotypes of poultry origen

DOI:10.34117/bjdv7n3-570

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 22/03/2021

Ana Paula Mallman

Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Instituição: Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI - Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE

Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel - PR

E-mail: ap.mallmann@hotmail.com

Camila Vogt dos Santos

Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Instituição: Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI- Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE

Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel - PR

E-mail: cami_vogt@hotmail.com

Thais Luft da Silva

Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Instituição: Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI- Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE

Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel - PR

E-mail: luft.thais@gmail.com

Débora Marina Bandeira

Mestranda em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Instituição: Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI- Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE

Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel - PR

E-mail: dm-bandeira@hotmail.com

Larissa Valéria Lakoski

Mestranda em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Instituição: Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI- Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE

Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel - PR

E-mail: lari_lakoski@hotmail.com

Jéssica Rosset

Graduanda de Licenciatura em Ciências Biológicas
Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE
Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel – PR
Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia - LAMIBI
E-mail: jessica.rosset@unioeste.br

Lázaro Henrique Soares de Moraes Conceição

Mestrando em Conservação e Manejo de Recursos Naturais
Instituição: Herbário UNOP - Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE
Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel – PR
E-mail: moraes_lazaro@hotmail.com

Fabiana Gisele da Silva Pinto

Doutor em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina
Instituição: Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI - Universidade
Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE
Endereço: Rua Universitária, 2069 - Campus Cascavel - CEP 85819-110 - Cascavel – PR
E-mail: fabiana.pinto@unioeste.br

RESUMO

A espécie *Ilex brevicuspis* Reissek é uma planta nativa do sul do Brasil, conhecida popularmente como caúna da serra e pertencente à família Aquifoliaceae. Espécies deste gênero têm despertado interesse, pelo potencial de suas atividades biológicas sobre microrganismos no setor industrial e avícola. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica dos extratos hexânico (EH) e acetônico (EA) de *Ilex brevicuspis*; determinar a atividade antibacteriana frente a dez sorotipos de *Salmonella* spp. de origem avícola e avaliar o potencial antioxidante destes extratos. A presença de metabólitos secundários foi analisada através da observação de mudanças de cor ou reações de formação de precipitados; a atividade antimicrobiana foi determinada pela metodologia da microdiluição em caldo; o potencial antioxidante dos extratos foi determinado pelo método fotocolorimétrico *in vitro* por sequestro do radical livre estável DPPH. Quanto à prospecção fitoquímica foram identificados no EH, compostos esteroides e flavonoides, e no EA, triterpenóides, taninos e flavonóides. Os extratos apresentaram atividade antibacteriana frente a todos os sorotipos de *Salmonella* testados, com valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (CIM/CBM) variando de 200 mg/mL a 12,5 mg/mL. Foi verificada atividade antioxidante acima de 70% na concentração de 15% para ambos os extratos. Portanto, os extratos vegetais de *I. brevicuspis* demonstraram ser uma importante fonte de flavonoides e taninos, com potencial atividade antibacteriana e antioxidante, podendo ser considerado uma alternativa promissora para controle de *Salmonella* no ambiente avícola.

Palavras-chave: CIM, Microdiluição, DPPH, Bioativos vegetais, Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The species *Ilex brevicuspis* Reissek is a plant native to southern Brazil, popularly known as caúna da serra and belonging to the Aquifoliaceae family. Species of this genus have aroused interest, due to the potential of their biological activities on microorganisms in the industrial and poultry sector. In view of this, the objective of this work was to perform the

phytochemical characterization of the hexane (HE) and acetonetic (AE) extracts of *Ilex brevicuspis*; to determine antibacterial activity against ten serotypes of *Salmonella* spp. of poultry origin and to evaluate the antioxidant potential of these extracts. The presence of secondary metabolites was analyzed by observing color changes or precipitate formation reactions; antimicrobial activity was determined by the broth microdilution methodology; the antioxidant potential of the extracts was determined by the photocolometric method in vitro by sequestering the stable free radical DPPH. As for phytochemical prospecting, steroidal and flavonoid compounds were identified in the HE, and in the AE, triterpenoids, tannins and flavonoids. The extracts showed antibacterial activity against all tested *Salmonella* serotypes, with minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration (MIC/MBC) values ranging from 200 mg/mL to 12.5 mg/mL. Antioxidant activity above 70% was found at a concentration of 15% for both extracts. Therefore, *I. brevicuspis* plant extracts proved to be an important source of flavonoids and tannins, with potential antibacterial and antioxidant activity, and can be considered a promising alternative to control *Salmonella* in the poultry environment

Keywords: MIC, Microdilution, DPPH, Plant bioactive, Secondary metabolites.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é um dos setores que mais cresce na última década entre as atividades voltadas para a produção animal. O Brasil ocupa posição de destaque, sendo atualmente o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango, com 13,25 milhões de toneladas do produto ao ano, além de produzir cerca de 49 bilhões de ovos (ABPA, 2020). Isso implica em atender as exigências do mercado consumidor no quesito de sanidade avícola e qualidade dos alimentos (KOTTWITZ et al., 2008).

Devido a esse crescimento rápido do setor avícola, passaram a ser incorporados produtos antimicrobianos e antioxidantes na ração das aves, pois, além de serem utilizados para o tratamento ou prevenção de doenças, também são utilizados no incremento da produção animal, como promotores de crescimento, pois, melhoram o desempenho do animal fazendo com que ganhe peso rapidamente, diminuindo assim, o tempo de produção de frangos, até que atinjam o ponto de abate (RIZZO et al., 2010). Com o elevado adensamento das aves nos criadouros, houve também um aumento significativo no número de casos de salmonelose, sendo esta a principal zoonose encontrada em ambiente avícola. A bactéria *Salmonella* spp. pode ser transmitida através do consumo de produtos avícolas, sendo uma das maiores preocupações de saúde pública, por causar doenças como gastroenterites e febre tifoide em humanos. Além disto, proporciona um grande impacto na cadeia avícola, uma vez que a contaminação de um lote pode ser facilmente transmitida para outras aves saudáveis (ANSARI et al., 2017; NIRMALA et al., 2018).

A utilização de antibióticos e antioxidantes sintéticos no enfrentamento desses problemas tem sido a prática comum na indústria de alimentação animal e humana. Entretanto, os rigores cada vez maiores das regulamentações internacionais e mesmo nacionais, que proíbem ou restringem a utilização de aditivos sintéticos na produção alimentícia, e a conscientização crescente dos consumidores, em decorrência das mudanças nos contextos socioeconômicos e culturais, têm aumentado progressivamente a demanda por produtos mais naturais e que tendem a oferecer menores riscos à saúde. Nesse sentido, a utilização de produtos de origem vegetal, tais como extratos vegetais têm demonstrado ser promissora, com a vantagem de, não deixar resíduos no ambiente ou alimento e, frequentemente, apresentarem baixa toxicidade a mamíferos (VIEIRA, et al. 2001).

Devido a esses problemas e com o aumento da preocupação da população em relação ao uso de produtos sintéticos, há uma demanda nos estudos em relação a atividades biológicas de produtos alternativos para se descobrir potenciais atividades antimicrobianas e antioxidantes que possam ser usados para controlar crescimento de patógenos como a *Salmonella* e em substituição aos antioxidantes sintéticos na indústria.

Nesse contexto é de grande importância avaliar atividades biológicas oriundas de produtos naturais, dentre eles extratos vegetais de plantas nativas, como é o caso de *Ilex brevicuspis* Reissek, pertencente à família Aquifoliaceae, que apresenta 600 espécies e é distribuída em um único gênero *Ilex*, das quais cerca de 60 ocorrem no Brasil. Uma das mais importantes plantas desse gênero, é *Ilex paraguasiensis* que apresenta diversas propriedades biológicas reconhecidas, como atividade antioxidante, antiobesidade e atividade antimicrobiana (ARÇARI et al., 2009; BONA et al., 2010), porém a espécie *I. brevicuspis* não apresenta relato de suas atividades na literatura.

Sendo assim, o presente estudo objetivou realizar a caracterização fitoquímica dos extratos hexânico (EH) e acetônico (EA) das folhas de *I. brevicuspis*, bem como investigar as atividades antimicrobiana e antioxidante frente a diferentes sorotipos de *Salmonella* spp avícola.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI), situado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. As folhas para o preparo dos extratos foram coletadas no Parque Ecológico Paulo Gorski, (24°

57°51" S 53° 26'2"W) na cidade de Cascavel, Paraná, Brasil. Uma exsicata da planta foi entregue ao Herbário UNOP para a identificação botânica e o registro do exemplar *voucher* UNOP 8924.

2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para o preparo dos extratos, seguindo a metodologia de Weber et al., (2014), as folhas coletadas foram secas em estufa de circulação de ar, por aproximadamente 24 horas e moídas em moinho de facas do tipo Willey, com granulometria de 0,42 mm para a obtenção do pó. Foram adicionadas 10 gramas do pó em 100 mL dos solventes, acetona P.A. e hexano P.A., sendo essa mistura mantida em agitador rotativo a 150 rpm por 24 horas. Após esse período, a mistura foi submetida à filtração a vácuo e, posteriormente, a centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. Para finalizar o material foi submetido à rotaevaporação para a total retirada do solvente. O extrato bruto, produzido ao final, foi acondicionado em recipientes de vidro e armazenados a 4°C ao abrigo da luz. O rendimento dos extratos vegetais foi calculado pela expressão da equação 1.

$$\text{Equação 1 - Porcentagem (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato (g)}}{\text{Massa vegetal seca e moída (g)}} * 100$$

2.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A identificação dos compostos presentes nos extratos foi realizada segundo metodologia descrita por Matos (1997) com modificações, de forma a se detectar a presença qualitativa de alcalóides, saponinas, esteroides livres, triterpenóides, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonoides, xantonas, chalconas, auronas, flavanonas, taninos condensados e cumarinas.

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)/ CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para a atividade antimicrobiana foram testados 10 sorotipos de *Salmonella* spp. de maior ocorrência na região Oeste do Paraná, Brasil, isoladas de aviários de frango de corte da região, sendo: *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Gallinarum*, *S. Mbandaka*, *S. Give*, *S. Saintpaul*, *S. Orion* e *S. Agona*, cedidos por um laboratório veterinário de Cascavel, Paraná, Brasil.

O teste para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) e SCUR et al. (2014), sendo realizadas a partir do método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. Para a determinação da CIM foram adicionados 150 µL de caldo Müller-Hinton (MH) em todos os poços, 150 µL dos extratos vegetais foi acrescentado no primeiro poço, com diluições seriadas que variaram de 200 até 0,09 mg/mL. Após as diluições, foram distribuídas alíquotas de 10 µl com sorotipos de *Salmonella* a 1×10^5 UFC/mL em cada poço e as placas foram incubadas a 36°C durante 24 horas. Como controle positivo foram realizadas diluições seriadas do antibiótico gentamicina, nas mesmas concentrações do extrato, e também adicionado 10 µl do inóculo bacteriano. Depois da incubação foi observada a turbidez e cada poço recebeu uma alíquota de 10 µl de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) para a revelação da inibição ou não das bactérias. Após a realização do ensaio da CIM, antes de realizar a adição de TTC, foi retirada uma alíquota de 2 µl e inoculada em Mueller-Hinton Ágar, para a determinação da CBM e as placas foram incubadas durante 24 horas a temperatura de 36°C, observando o crescimento ou não bacteriano. A atividade dos extratos foi classificada de acordo com Pandini et al. (2015) sendo os extratos com atividade alta (<12,5 mg/mL), moderada (12,5 a 25 mg/mL), baixa (50 a 100 mg/mL) e muito baixa (>100 mg/mL).

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos hexânico (EH) e acetônico (EA) foram analisadas de acordo com a metodologia proposta por Rufino et al. (2007) e Weber et al. (2014), baseadas na redução do radical livre DPPH. Uma alíquota de 0,1 mL dos extratos foi adicionada a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 0,2m. As amostras foram mensuradas em espectrofotômetro com absorvância de 515 nm. Como controle negativo foi utilizado 0,1 mL de solução controle de metanol e para controle positivo foi utilizado o antioxidante butil-hidroxi-tolueno (BHT). Os testes foram realizados em triplicata. O cálculo da capacidade de sequestro do radical livre foi expresso pela equação 2, sendo Abs0 é a absorvância do controle e Abs1 é a absorvância da amostra.

$$\text{Equação 2 - AA\%} = \frac{\text{Abs0} - \text{Abs1}}{\text{Abs0}} * 100$$

Para o cálculo de IC₅₀ (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH), foram utilizadas as concentrações dos extratos vegetais e do BHT para obter a equação da reta com R² maior que 0,80, e assim, encontrar o valor de IC₅₀, a partir de regressão linear. Os testes foram realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. Os resultados de IC₅₀ foram analisados usando ANOVA com teste de Tukey (p < 0,05) utilizando o programa estatístico R[®] versão 3.3.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

O rendimento dos extratos vegetais foi de 11,75% para EA e 5% para EH, sendo observado maior rendimento para o solvente polar (acetona) quando comparado com o apolar (hexano). Diversos fatores são capazes de influenciar o rendimento dos extratos vegetais, tais como o método extrativo, temperatura utilizada, tempo de extração (FRANZEN et al., 2018) e principalmente, a seleção do solvente, sendo que sua polaridade e solubilidade influenciam diretamente sobre o rendimento dos mesmos (CABANA et al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013; GUIMARÃES SOBRINHO et al., 2020).

3.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS

De acordo com a prospecção fotoquímica dos extratos foi identificada a presença dos compostos pertencentes classe dos esteroides triterpenóides e livres, flavonas, flavonoides, xantonas e taninos. Os esteroides livres foi a única classe de metabólitos secundários presentes em todos os extratos. O extrato que apresentou a maior diversidade de metabólitos secundários foi o EH, sendo identificados esteroides e compostos do grupo flavonoides, como flavonas, xantonas e flavanóides. Já no EA foi verificada a presença de esteroides e taninos (Tabela 1).

Tabela 1. Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais foliares acetônico e hexânico de *I. brevicuspis*.

Metabólitos secundários	EA	EH
Saponinas	-	-
Esteróides triterpenoides	+	-
Esteróides livres	+	+
Triterpenoides	-	-
Alcaloides	-	-
Antocianinas	-	-
Antocianidinas	-	-

Flavonas	-	+
Flavonóides	-	+
Xantonas	-	+
Chalconas	-	-
Auronas	-	-
Flavanonas	-	-
Taninos condensados	+	-
Cumarinas	-	-

(+) presença; (-) ausência. EA= extrato acetona; EH= extrato hexano. Fonte: autores

O método mais comumente utilizado para a extração de compostos em extratos vegetais é através de solventes ou misturas de solventes. A literatura relata que os mais utilizados e recomendados na extração de metabólitos são metanol, etanol, acetona e hexano (CABANA et al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013; SILVA et al., 2010).

Dentro do gênero *Ilex*, as classes de metabólitos secundários mais relatadas são xantinas, saponinas e os compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides (FILIP et al., 2000; COSTA et al., 2017). Taketa et al. (2002) isolaram triterpenos e saponinas das folhas de *I. brevicuspis*, sendo encontrados derivados de acetil, derivados de peracetil e saponinas livres. Embora nossos estudos também sejam com essa espécie, existem diferenças nos compostos encontrados em ambas as pesquisas, devido provavelmente aos fatores ambientais, tais como: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, ritmo circadiano, poluição atmosférica e proteção contra patógenos, que pode afetar a via metabólica e, conseqüentemente, influenciar nos compostos produzidos pela planta (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Em relação à atividade antimicrobiana, observou-se que os extratos apresentaram variações de acordo com o solvente extrator e o microrganismo testado. O EH, apresentou as melhores atividades antimicrobianas demonstrando uma atividade moderada, segundo a classificação de Pandini et al (2015). Os sorotipos mais suscetíveis a esses extratos foram *S. Santpaul*, *S. Give* e *S. Typhimurium* com CIM de 12,5 mg/mL e a CBM de 25 mg/mL. Já o EA, apresentou uma atividade baixa, sendo que os valores de CIM variaram de 25 mg/mL a 100 mg/mL, e os valores de CBM foram de 200 mg/mL para todos os sorotipos, exceto para *S. Gallinarium*, que não sofreu ação bactericida por esse extrato (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos foliares acetônico (EA) e hexânico (EH) das folhas de *I. brevicuspis* frente sorotipos de *Salmonella* spp.

Microrganismos	EA (CIM / CBM mg/mL)	EH (CIM / CBM mg/mL)
S. Agona	25/200	25/50
S. Santpaul	25/200	12,5/25
S. Heidelberg	50/200	50/100
S. Orion	50/200	25/50
S. Give	50/200	12,5/25
S. Gallinarium	50/-	25/50
S. Mbandaka	100/200	12,5/50
S. Infantis	50/200	50/200
S. Typhimurium	100/200	12,5/25
S. Enteritidis	50/200	50/200

(-) Sem atividade. EA= extrato acetona; EH= extrato hexano. Fonte autores

Não foram encontrados estudos referentes à atividade antimicrobiana de *I. brevicuspis*, porém, De Bona et al. (2010) relataram atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *I. paraguariensis* frente a 14 sorotipos de *Salmonella*, dentre eles, *S. Orion*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis* e *S. Mbandaka*, sorotipos que também foram analisados em nosso estudo. Os valores de inibição variaram de 150 mg/mL a 200 mg/mL, o que corrobora com os nossos resultados.

Outra pesquisa avaliou a atividade antimicrobiana por meio de disco difusão dos extratos aquoso e etanólico de *I. paraguariensis* frente a cepas de *E. coli* e *P. mirabilis* isoladas de carne de frango. Os extratos apresentaram inibição sobre cepas testadas na concentração de 400mg/mL (COSTA et al., 2017), vale salientar que assim como *Salmonella*, ambas as bactérias desse estudo são Gram-negativas e apresentam parede bacteriana mais complexa quando comparadas as bactérias Gram-positivas.

Devido às possíveis propriedades antimicrobianas dos metabólitos secundários em plantas, sugere-se que o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais de *I. brevicuspis* esteja relacionado aos componentes de seu perfil fitoquímico. Esses compostos podem estar ligados diretamente à ação antimicrobiana dos extratos, visto que os flavonoides, encontrados no EH, atuam na membrana plasmática e na parede bacteriana, causando rupturas e, conseqüentemente, diminuindo a fluidez, além de inibir a síntese de ácidos nucleicos e o metabolismo energético (SAMY & GOPALAKRISHNAKONE, 2010; CUSHNIE & LAMB, 2011). Além disso, os taninos encontrados no extrato de acetona são adstringentes e capazes de precipitar proteínas, o que causa um efeito antimicrobiano e antifúngico (MONTEIRO et al., 2005; JARDIM et al., 2019).

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

Os resultados da atividade antioxidante foram ensaiados pela técnica de sequestro de radical livre (DPPH). Esse ensaio trata-se de um método direto e confiável para medir a capacidade anti-radical de extratos vegetais (CABANA et al., 2013). Os melhores resultados da atividade antioxidante foram apresentados pelo EA a 20 mg/mL obtendo um potencial de 82,67% e IC₅₀ 8,29±0,05 (Tabela 3, Tabela 4). Já para o EH, a maior atividade antioxidante foi observada a 25 mg/mL apresentando potencial de 82,45% e IC₅₀ 11,29±0,03. Em ambos os EH (25 mg/mL) e EA (20 mg/mL), os melhores resultados foram observados nas maiores concentrações analisadas. O controle utilizando BHT apresentou 98,57% de atividade na concentração padrão e IC₅₀ 0,26±0,006.

Tabela 3. Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos foliares acetônico (EA) e hexânico (EH) de *I. brevicuspis* por sequestro do radical DPPH.

Concentração (mg/mL)	Controle BHT	EA	EH
25	-	-	82,45±0,49
20	-	82,67±0,41	79,72±0,66
15	-	71,58±1,32	70,10±0,62
10	-	61,53±0,68	46,44±1,25
5	-	43,66±2,13	33,49±0,84
2,5	-	33,49±0,73	20,27±0,66
1	98,57±0,54	20,54±0,73	-
0,5	77,32±0,67	-	-
0,25	54,46±4,69	-	-
0,1	37,85±2,99	-	-
0,05	22,50±3,19	-	-
0,025	10,17±1,65	-	-

(-) não testado; média ± desvio padrão. EA= extrato acetônico; EH= extrato hexânico. BHT= butil-hidroxi-tolueno. Fonte: autores

Tabela 4. Valor de IC₅₀ pelo ensaio do DPPH dos extratos vegetais foliares acetônico (EA) e hexânico (EH) de *I. brevicuspis*.

Amostras	IC ₅₀ (mg/mL)	Equação	R ²
BHT	0,26±0,006	y = 75,471x + 29,535	0,9216
EA	8,29±0,05	y = 3,1433x + 23,938	0,9524
EH	11,29±0,03	y = 2,7772x + 18,619	0,9402

média ± desvio padrão. EA= extrato acetônico; EH= extrato hexânico. BHT == butil-hidroxi-tolueno. Fonte: autores

O efeito sequestrador de radicais livres dos extratos foi considerado dependente da concentração, e de modo geral, foi verificado que os extratos necessitam de concentrações maiores para alcançar o máximo de potencial antioxidante quando comparado ao controle BHT. Contudo, tanto o EA quanto EH apresentaram porcentagem de sequestro de DPPH acima de 80% (Tabela 3).

Além do DPPH, já foram relatadas as atividades antioxidantes dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*, *I. pseudobuxus*, *I. argentina*, *I. dumosa*, *I. theezans*, a partir do método de oxidação de lipossomos oxidados por dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH), apresentando aproximadamente 95%, 95%, 90%, 40% e 30% de atividade, respectivamente, além disso os extratos também apresentaram compostos fenólicos na sua composição (FILIP et al., 2000). A distribuição desses compostos nas plantas está atribuída a diversos fatores e sua ação é de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, pois apresentam propriedades capazes de realizar absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Não foram encontrados outros estudos de *I. brevicuspis* na literatura, porém, Schinella et al. (2000) verificaram a atividade antioxidante em outra espécie do gênero *Ilex*, *I. paraguariensis* por diversos métodos, dentre eles o método de sequestro de DPPH, que demonstrou 90% de atividade antioxidante quando avaliada a 0,5 mg/mL.

Dessa forma, foi verificado o importante papel dos solventes na determinação das atividades biológicas, como a atividade antioxidante e antimicrobiana, além de suas características determinantes na extração de compostos bioativos. Estudos relacionados à atividade antioxidante de produtos naturais têm sido cada vez mais enfatizada com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos que podem ser prejudiciais a saúde da população.

Nesse estudo, os solventes acetona (polar) e hexano (apolar) apresentam características que confere a eles atividades biológicas e aos componentes por eles extraídos. No caso dos taninos, encontrados no EA, alta atividade biológica é atribuída à sua habilidade de se ligar a proteínas ou outras macromoléculas e sua capacidade de se complexar a íons metálicos que são co-fatores enzimáticos, promovendo atividade inibitória ou bactericida sobre microrganismos (MONTEIRO et al., 2005).

4 CONCLUSÕES

A partir da prospecção fitoquímica dos EA e EH das folhas de *I. brevicuspis* foi identificada a presença de esteróides, flavonóides, flavonas, xantonas e taninos. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os sorotipos de *Salmonella* spp. Foi verificada atividade antioxidante acima de 70% na concentração de 15% para ambos os extratos e acima de 82% nas concentrações mais elevadas. As bioatividades demonstradas devem estar relacionadas aos compostos do metabolismo secundário presente nos extratos e com comprovada ação sobre os organismos avaliados. Os resultados revelam a importância de estudos para compreender o potencial e a ação de extratos

vegetais, e sua possível utilização como alternativa para substituir o uso extensivo de antimicrobianos e antioxidantes sintéticos na cadeia avícola, com o intuito também de diminuir os impactos causados ao meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Manejo e Conservação de Recursos Naturais (PPRN).

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal Relatório anual de 2020. Disponível em: <http://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2020.pdf>. Acesso em 24 fev 2021.

ANSARI, F.; POURJAFAR, H.; BOKAIE, S.; PEIGHAMBARI, S. M.; MAHMOUDI, M.; FALLAH, M. H.; TEHRANI, F.; RAJAB, A.; GHAFOURI, S. A.; SHABANI, M. Association between poultry density and *Salmonella* infection in commercial laying flocks in Iran using a kernel density. *Pakistan Veterinary Journal*, v.3, n.37, p. 299-304, 2017. Disponível em: <http://dSPACE.tbzmed.ac.ir/xmlui/handle/123456789/46126>. Acesso em 24 fev 2021.

ARÇARI, D. P.; BARTHCHEWSKY, W.; SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; SOUZA, M.F.F.; SAAD, M.J.; BASTOS, D.H.M; GAMBERO, A.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* (Silver Spring, Md.), v. 17, n. 12, p. 2127–2133, 14 dez. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19444227/>. Acesso em 24 fev 2021.

CABANA, R.; SILVA, L.R.; VALENTAO, P.; VITURRO, C.I.; ANDRADE, P.B. Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, v.48, p.49-56, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669013001635>. Acesso em 24 fev 2021.

CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), v. 35, n. 2, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3>. Acesso em 25 fev 2021.

COSTA, D.E.M.; RACANICCI, A.M.C.; SANTANA, A.P. Atividade antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contra microrganismos isolados da carne de frango. *Ciência Animal Brasileira*, v.18, p.1-7, 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-8912017000100601. Acesso em 24 fev 2021.

CUSHNIE, T. P. T; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.38, p.99-107, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21514796/>. Acesso em 24 fev 2021.

DE BONA, E.A.M.; PINTO, F.G.S; BORGES, A.M.C.; WEBER, L.D.; FRUET, T.K.; ALVES, L.F.A.; MOURA, A.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre sorovares de *Salmonella spp.* de origem avícola. *Journal of Health Sciences*, v. 12, n.3, p.45-48, 2010. Disponível em: <https://revista.pgskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/1297/1242>. Acesso em 24 fev 2021.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/540>. Acesso em 24 fev 2021.

FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A.; PEREIRA, E.; FREIRE, M.S.; VALENTÃO, P., ANDRADE, P.B.; GONZÁLEZ ÁLVAREZ, J.A.; PEREIRA, J.A. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, v.42, p. 126–132, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669012002865>. Acesso em 25 fev 2021.

FILIP, R.M.S.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.M.S.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, v.20, n.10, p. 1437-144, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S027153170080024X>. Acesso em 24 fev 2021.

GUIMARÃES SOBRINHO, A. C.; ROGEZ, H. L. G.; NASCIMENTO, V. H.A.; TEIXEIRA, B. J.B.; DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S. Determinação de compostos bioativos e capacidade sequestradora de radicais livres em extratos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 6, p. 34954-34969, 2020.

GOBBO-NETTO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v.30, n.2, p. 374-381, 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200026. Acesso em 24 fev 2021.

JARDIM, M.F.H.; FURLAN, L.C.O.; CARVALHO, I.S.; BARBOSA, L.N.; OTUTUMI, L.K.; JACOMASSI, E.; GERMANO, R.M. Atividade antibacteriana e antioxidante dos extratos aquosos das folhas e dos rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe cultivadas no horto medicinal da Unipar. *Brazilian Journal of Development*, v.5, n.10, p. 18292-18309, 2019.

KOTTWITZ, L.B.M.; BACK, A.; LEÃO, J.A.; ALCOCER, I.; KARAN, M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.2, p. 496-498, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n2/a34v60n2.pdf>. Acesso em 24 fev 2021.

MATOS, F.J.A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 1997. Acesso em 24 fev 2021.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAUJO, E.L.; AMORIM, E.L.B. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892, 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422005000500029&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em 24 fev 2021.

NIRMALA, T.V.; REDDY, A.D.; SREE, E.K.; SUBBAIAH, K.V.; RAJU, G.S.; REDDY, R.V.S.K. Salmonellosis in Poultry: a case report. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.7, n.2, p.2347-2349, 2018. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/323548998_Salmonellosis_in_Poultry_A_Case_Report. Acesso em 25 fev 2021.

PANDINI, J.A.; PINTO, F.G.S.; SCUR, M.C.; ALVES, L.F.A.; MARTINS, C.C. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. Journal of Medicinal Plants Research, v.9, n.3, p.48-55, 2015. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/3223BD150285>. Acesso em 24 fev 2021.

RIZZO, P. V.; MENTEN, J. F. M.; RACANICCI, A. M. C.; TRALDI, A. B.; SILVA, C. S.; PEREIRA, P. W. Z. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, n.4, p. 801-807, 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982010000400015. Acesso em 24 fev 2021.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Embrapa, v.127, p.1-4, 2007. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf. Acesso em: 25 fev 2021.

SAMY, R.P., GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.7, p. 283-294, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887332/>.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10708556/>. Acesso em 24 fev 2021.

SCUR, M.C.; PINTO, F.G.S.; BONA, E.A.M.; WEBER, L.D.; ALVES, L.F.A.; MOURA, A.C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. African Journal of Agricultural Research, v.9, n.9, p.823-830, 2014. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/22E416144777>. Acesso em 24 fev 2021.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Composto fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos naturais. Semina: Ciências Agrárias, v.31, n.3, p. 669-681, 2010. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/6510/5926>. Acesso em 24 fev 2021.

TAKETA, A.T.C.; GONDORF, M.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E.P. New triterpene and triterpenoid glycosides from *Ilex brevicuspis*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.38, n.2, p. 155-161, 2002. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S151693322002000200004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en. Acesso em 24 fev 2021.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI J.; BIAVATTI M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA A. G. Produtos naturais no controle de insetos. São Carlos:

EdUFSCar, p. 176, 2001. Disponível em:
<https://www.scielo.br/pdf/rca/v44n3/a27v44n3.pdf>. Acesso em 24 fev 2021.

WEBER, L.D.; PINTO, F.G.S.; SCUR, M.C.; SOUZA, J.G.L.; COSTA, W.F.; LEITE C.W. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. African Journal of Agricultural Research, v.9, n.9, p. 846-853, 2014. Disponível em:
https://academicjournals.org/article/article1393337192_Weber%20et%20al.pdf. Acesso em 24 fev 2021.