

MICROBIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL *IN FOCO*



ORGANIZADORAS

**CAMILA VOGT DOS SANTOS
DEBORA MARINA BANDEIRA
FABIANA GISELE DA SILVA PINTO**



Editora Poisson

Camila Vogt dos Santos
Debora Marina Bandeira
Fabiana Gisele da Silva Pinto
(Organizadoras)

Microbiologia e Biotecnologia Ambiental in foco

Volume 1



1ª Edição

Belo Horizonte
Editora Poisson
2024

Editor Chefe: Dr. Darly Fernando Andrade

Conselho Editorial

Dr. Antônio Artur de Souza – Universidade Federal de Minas Gerais
MSc. Davilson Eduardo Andrade

Dra. Elizângela de Jesus Oliveira – Universidade Federal do Amazonas
MSc. Fabiane dos Santos

Dr. José Eduardo Ferreira Lopes – Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Otaviano Francisco Neves – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Dr. Luiz Cláudio de Lima – Universidade FUMEC

Dr. Nelson Ferreira Filho – Faculdades Kennedy

MSc. Valdiney Alves de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626

Microbiologia e Biotecnologia Ambiental in foco
Volume 1/ Organização: Camila Vogt dos Santos,
Inalda Maria Martins Olímpio, Debora Marina
Bandeira, Fabiana Gisele da Silva Pinto - Belo
Horizonte - MG: Poisson, 2024

Formato: PDF

ISBN: 978-65-5866-371-3

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

1. Microbiologia 2. Biotecnologia. I. SANTOS,
Camila Vogt dos II. BANDEIRA , Debora Marina
III. PINTO, Fabiana Gisele da Silva IV. Título

CDD-570

Sônia Márcia Soares de Moura - CRB 6/1896



O conteúdo deste livro está licenciado sob a Licença de Atribuição Creative Commons 4.0.

Com ela é permitido compartilhar o livro, devendo ser dado o devido crédito, não podendo ser utilizado para fins comerciais e nem ser alterada.

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

Esse e outros títulos podem ser baixados gratuitamente em www.poisson.com.br

Entre em contato pelo contato@poisson.com.br



Organizadoras

Camila Vogt dos Santos

Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) /Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (UNIOESTE)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/Rua Universitária - 1619, Universitário, Cascavel, Paraná – Brasil.

Debora Marina Bandeira

Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) /Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (UNIOESTE) /Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE /Rua Universitária – 1619, Universitário, Cascavel, Paraná – Brasil.

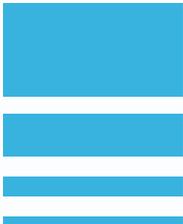
Fabiana Gisele da Silva Pinto

Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) /Doutora em Microbiologia /Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN) /Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE /Rua Universitária – 1619, Universitário, Cascavel, Paraná – Brasil.



Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Unioeste do Campus de Cascavel - PR, por ofertar o espaço para realização dos experimentos. Ao programa de Pós Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel - PR. A CAPES e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa via NAPI Biodiversidade: Recursos Genéticos e Biotecnologia e Vale S.A., Instituto Chico Mendes de Conservação para a Biodiversidade (ICMBio) e ao Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade (IABS) pelo fomento do projeto DIVERSIDADE METABARCODING E FUNCIONAL DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE NACIONAL DOS CAMPOS FERRUGINOSOS - PA contemplado por meio do Edital de Chamada Pública 01/2021, Item XXI da Cláusula Segunda do TCCE no 1/2018/ICMBio. Convênio 033/2021 IABS/Unioeste.”



Prefácio

O livro Microbiologia e Biotecnologia Ambiental *in foco* apresenta os temas centrais das pesquisas conduzidas no Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI), localizado no Campus de Cascavel, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Cada capítulo abrange investigações no campo das Ciências Ambientais, integrada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN), onde os alunos de graduação e mestrado dedicam-se a pesquisas que resultam em trabalhos acadêmicos, englobando Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC), Projetos de Iniciação Científica (IC), dissertações e relatórios finais de disciplinas cursadas no PPRN. O capítulo 1, trás a relevancia do estudo de prospecção e a compreensão dos processos de resistência de microrganismos de cavernas da Amazônia Oriental, ainda pouco explorada. Os primeiros capítulos, do 2 ao 5, abordam a importância de produtos naturais, como extratos e óleos essenciais no combate da resistência bacteriana, bem como sua atividade antioxidante. Além disso, demonstra as vantagens e desvantagens dos principais métodos de extração de bioativos vegetais. Os capítulos 6 e 7 foram elaborados durante a disciplina de mestrado Métodos de Análises Ambientais ofertada junto ao PPRN, e aborda por diferentes ângulos a importância e relevância dos bioindicadores, preferencialmente os microbiológicos na qualidade de água de ambiente aquático. Por fim, o capítulo 8 aborda a prospecção e caracterização de rizobactérias isoladas de Unidades de Conservação do Paraná, especificamente no Parque Estadual do Guartelá – PR para avaliação do potencial agrícola dessas bactérias como promotoras de crescimento vegetal e uma alternativa mais sustentável que os agroquímicos.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas em cavernas ferríferas da Amazônia Oriental-Pará, Brasil 08

Mayara Maria de Souza, Maiara Zonin, Debora Marina Bandeira, Jéssica Rosset, Luana de Souza, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.01

Capítulo 2: Extratos vegetais: uma perspectiva comparativa entre métodos de extração clássicos e avançados..... 17

Adriá Braun Vieira, Camila Vogt dos Santos, Debora Marina Bandeira, Débora Pedroso, Jéssica Rosset, Mayara Maria de Souza, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.02

Capítulo 3: Combatendo a ameaça da *Salmonella* na avicultura: o potencial de óleos essenciais e extratos vegetais como alternativas sustentáveis 30

Camila Vogt dos Santos, Mayara Maria de Souza, Andressa Guarnieri Canton, Debora Marina Bandeira, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-XXX-X.CAP.03

Capítulo 4: Potencial antioxidante dos óleos essenciais de *Myrcia*: uma perspectiva para produtos naturais e sustentáveis..... 39

Amanda Janaina Gonsatti Feitosa, Camila Vogt dos Santos, Debora Marina Bandeira, Andressa Guarnieri Canton, Jéssica Rosset, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.04

Capítulo 5: Perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella enterica* provenientes de carcaças de frango do Oeste do Paraná..... 46

Lais Gabriela Rizzoto, Camila Vogt dos Santos, Mayara Maria de Souza, Debora Marina Bandeira, Jaíne Freita de Souza, Andressa Guarnieri Canton, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.05

Capítulo 6: Bioindicadores microbiológicos: ferramentas essenciais para a gestão sustentável dos recursos hídricos..... 56

Amanda Janaina Gonsatti Feitosa, Emanuel Sobocinski Zanini, Gabrielle Jovana Antoniazzi, Luana de Souza, Maria Julia Lopes da Silva, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.06

Capítulo 7: Avaliação da qualidade microbiológica da água e sedimento no lago municipal de Cascavel-PR: perfil de resistência e potencial patogênico de microrganismos indicadores ambientais 65

Larissa de Assis Carretts, Adriá Braun Vieira, Debora Marina Bandeira, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.07

Capítulo 8: Explorando o potencial agrícola do Paraná: prospecção e caracterização de rizobactérias isoladas do Parque Estadual do Guartelá..... 78

Luana de Souza, Debora Marina Bandeira, Camila Vogt dos Santos, Débora Pedroso, Jaíne Freita de Souza, Mayara Maria de Souza, Fabiana Gisele da Silva Pinto

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.08

Capítulo 1

Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas em cavernas ferríferas da Amazônia Oriental-Pará, Brasil

Mayara Maria de Souza¹

Maiara Zonin²

Debora Marina Bandeira³

Jéssica Rosset⁴

Luana de Souza⁵

Fabiana Gisele da Silva Pinto⁶

Resumo: As cavernas são ambientes geologicamente isolados, oligotróficos, predominando a quimiolitotrofia, e com capacidade de abrigar uma elevada diversidade microbiana que desempenham funções biológicas para sobrevivência nesses ambientes. Por serem ambientes pouco estudados, apresentam escassez de trabalhos na literatura relacionados ao perfil de resistência bacteriana no ambiente cavernícola. O objetivo desta pesquisa foi avaliar 53 bactérias isoladas de solo de duas cavernas ferríferas (GEM-1423 e GEM-1462) da Serra da Bocaina, localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no município de Canaã dos Carajás, PA, BR, quanto ao seu perfil de resistência à 12 antimicrobianos comerciais. A coleta ocorreu nas estações seca e chuvosa, período que compreende os meses de setembro de 2022 e março de 2023, respectivamente, e foram amostrados três diferentes pontos: zona fótica, penumbra e afótica de cada caverna. A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada por meio da técnica de disco-difusão e o perfil de resistência antimicrobiana foi avaliado de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Os agentes antimicrobianos testados foram: Amoxicilina (10 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Estreptomicina (10 µg), Imipenem (10 µg), Gentamicina (10 µg), Norfloxacin (10 µg), Trimetoprima (5 µg), Sulfazotrim (25 µg) e Tetraciclina (30 µg). Os resultados revelaram uma variação no perfil de resistência antimicrobiana, sendo mais elevada na estação chuvosa (92,8%) em comparação com a estação seca (68,7%) em ambas as cavernas. Cerca de 80% das bactérias demonstraram resistência a pelo menos dois antimicrobianos. Os isolados bacterianos apresentaram resistência elevada aos antimicrobianos Ampicilina, Amoxicilina e Trimetoprima. Os resultados obtidos evidenciam a presença de genes de resistência a antimicrobianos nas bactérias cavernícolas e a investigação propõe que a resistência observada, nesse contexto, seja intrínseca e que tais microrganismos desenvolveram adaptações ao ambiente cavernícola, sugerindo uma possível evolução direcionada pela pressão seletiva do ambiente.

Palavras-chave: Cavernas ferríferas. Antimicrobianos. Resistência bacteriana.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0000-0444-1442>

² Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0007-2460-1379>

³ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-5956-7210>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-8348-0649>

⁵ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0851-2161>

⁶ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>

1. INTRODUÇÃO

O Brasil reúne algumas das maiores formações ferríferas mundiais, dentre elas destaca-se as formações ferríferas dos Campos Ferruginosos no Pará, que se tornaram grande alvo de estudo nos últimos anos. São caracterizadas por conterem depósitos de minerais de ferro, com condições ambientais peculiares que contribuem para evolução de microrganismos presentes nesse ecossistema, pesquisas a respeito dessa temática descrevem uma microbiota rica, com grande diversidade e alto potencial para auxiliarem no desenvolvimento microbiológico aliado com a biotecnologia (Çandiroğlu; Güngör, 2020).

Tratando-se de desenvolvimento microbiológico, um dos maiores produtos é a descoberta de antimicrobianos que tem grande sucesso, sendo seu uso clínico o mais significativo da história (Ambrožič; Petrič; Pašić, 2019). Todavia, o uso irresponsável desses medicamentos contribui para o aumento de resistência bacteriana, diminuindo sua eficácia.

Assim, bactérias ambientais, especificamente de ambientes cavernícolas, tornam-se uma fonte importante para desenvolvimento de compostos bioativos devido a sua capacidade de adaptação em ambientes extremófilos. A extensa presença de bactérias ambientais resistentes a antimicrobianos representa um indicador relevante da produção dessas substâncias, conforme evidenciado por estudos sobre a prevalência generalizada de resistência a antibióticos em bactérias do ambiente (D'Costa et al., 2006; Nodwell, 2007).

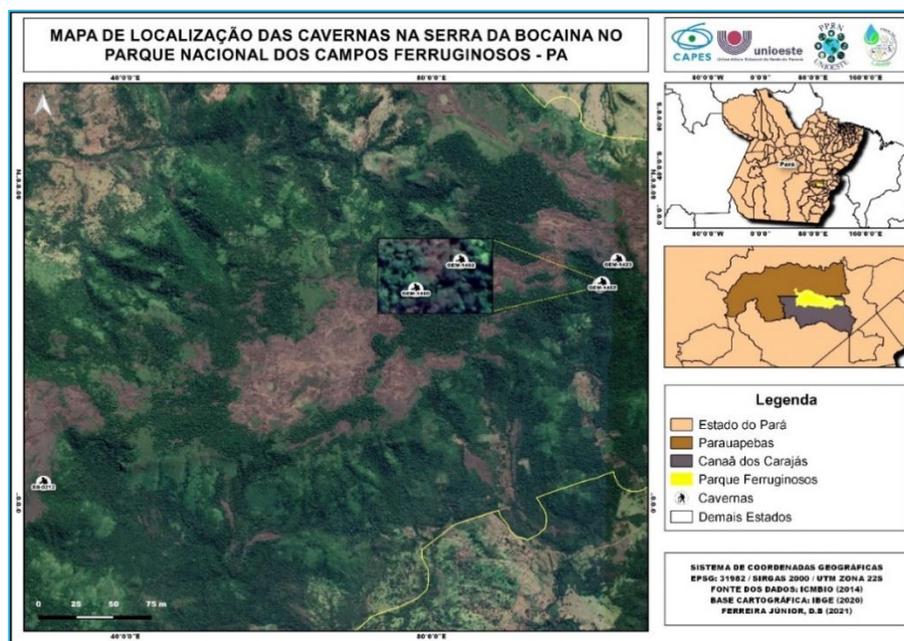
Desvendar o potencial dessas bactérias nos dá um ponto de partida para desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. Neste contexto, foram avaliados o perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de solo, nas estações seca e chuvosa, de duas cavernas ferríferas da Serra da Bocaina GEM-1423 e GEM-1462, localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no município de Canaã dos Carajás, Pará, Brasil.

2. METODOLOGIA

2.1. ÁREA DE ESTUDO

O local de estudo foi a Serra da Bocaina, localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no município de Canaã dos Carajás, Pará. Com base em dados secundários do Relatório de Diagnóstico e Análise de Relevância existem cerca de 235 cavernas nesta região (Piló et al., 2014). Foram selecionadas duas cavernas de relevância máxima, de litologia jaspilito/canga GEM-1423 (6°18'49.27"S, 49°53'35.06"O) e jaspilito GEM-1462 (6°18'59.18"S, 49°53'41.71"O), considerando as características de litologia, morfologia, hidrologia, presença ou ausência de matéria orgânica e presença de solo, informações estas indicadas no mapa topográfico, ficha geo e bioespeleologia.

Figura 1- Mapa de localização das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 localizadas na Serra da Bocaina, Parque Nacional dos Campos Ferruginosos



Fonte: FERREIRA, JÚNIOR D.B, (2021).

2.2. COLETA DAS MOSTRAS

A coleta ocorreu sob a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 86153-1 na estação seca e chuvosa, período esse que compreende os meses de setembro de 2022 e março de 2023, respectivamente. As amostras foram coletadas na camada superficial da caverna, nos primeiros 10 cm. A caverna foi classificada em zonas, de acordo com Trajano & Bichuette (2006), coletando-se 100g de solo de três pontos em cada zona, ou seja, três na zona afótica (ausência de luz), três na disfótica (penumbra) e três na entrada, totalizando 9 pontos de amostragem. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis (ziplock), com o auxílio da pá de jardinagem estéril, sendo limpa a cada coleta com álcool 70%, identificadas com o nome/número da caverna, número da amostra, data da coleta e nome do coletor responsável e armazenadas em caixa térmica a 4°C para a análise.

2.3. ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE MICRORGANISMO

No laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), as amostras de solo foram peneiradas, homogêneas, retiradas subamostras (10 g) e enriquecidas em frascos contendo 90 mL de meio salino mineral (MSM), em solução salina NaCl a 0,85% em 90 mL de água destilada. As amostras foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm, 28°C por 24 horas. Após esse período, foram realizadas diluições em série, sendo retiradas alíquotas de 100 µL das diluições de 10^{-1} a 10^{-3} e semeadas nas superfícies dos meios Luria Bertani (LB), ISP₂ (Pridham et al., 1957) e Batata-Dextrose-Ágar (BDA) com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas à 28°C no período de 24 a 48 h. As linhagens microbianas foram divididas por caverna e zona, identificadas como IM (GEM-1423) e SC

(GEM-1462) com o sufixo da estação chuvosa (C), estação seca (S) e sufixo da zona fótica (F), penumbra (P) ou afótica (A) e número nominal crescente e posteriormente conservadas em meio Ágar Estoque e à -80°C .

2.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Os isolados foram crescidos em meio LB líquido à $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h e, em seguida, foi realizada a coloração de Gram. Os isolados foram observados em microscópio óptico com aumento de 100 X e caracterizados com base em sua morfologia e coloração.

2.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

O perfil de resistência antimicrobiana foi avaliado de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2018). Os antimicrobianos testados foram: Amoxicilina (10 μg), Ácido Nalidíxico (30 μg), Ampicilina (10 μg), Ciprofloxacina (5 μg), Cloranfenicol (30 μg), Estreptomicina (10 μg), Imipenem (10 μg), Gentamicina (10 μg), Norfloxacina (10 μg), Trimetoprima (5 μg), Sulfazotrim (25 μg) e Tetraciclina (30 μg). Os resultados obtidos foram comparados com os dados da tabela padrão do documento M100-S17 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

Os isolados bacterianos selecionados foram retirados do estoque, com auxílio de alça bacteriológica estéril, e semeados no meio sólido Ágar LB por estriamento descontínuo e incubados por 24h a 30°C . Após esse período, foi realizado o inóculo com colônias isoladas e resuspendidas em 5ml de caldo Mueller Hinton (CMH) a fim de se obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Essa avaliação foi feita por meio da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966) que consiste em após a homogeneização do inóculo, foi introduzido um suabe estéril dentro do tubo, e em seguida, este foi comprimido contra a parede do tubo para a remoção do excesso de líquido. A inoculação foi feita em forma de estrias contínuas na superfície do ágar em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria. Antes da aplicação dos discos, as placas semeadas foram deixadas em cima da bancada por aproximadamente cinco minutos, para permitir que o excesso de umidade da superfície do ágar fosse absorvido. Os discos foram retirados do freezer uma hora antes de sua aplicação e deixados em temperatura ambiente. A aplicação destes foi realizada com auxílio de uma pinça estéril para evitar contaminação. Todos os discos foram pressionados suavemente para o contato total com a superfície do ágar. Após 24h de incubação, as placas foram analisadas para verificar a presença de contaminantes e a ocorrência de halos de inibição. A leitura foi realizada com auxílio de um paquímetro. Os testes foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados um total de 183 microrganismos das amostras de solo cavernícola nas duas coletas. Na primeira coleta, no período seco (setembro 2022), obteve-se 50 isolados da caverna GEM-1462 e 32 isolados da caverna GEM-1423. Na segunda coleta, que compreende o período chuvoso (março 2023), foram isolados 44 microrganismos na caverna GEM-1462 e 57 na caverna GEM-1423.

As amostras de bactérias foram selecionadas aleatoriamente, de duas cavernas distintas, totalizando 53 bactérias, sendo que 52,8% foram classificadas como Gram-positivas e 47,2% Gram-negativas. Dentre as cepas Gram-positivas, 25 apresentaram forma de bacilo e 3 foram cocos. Já dentre as cepas Gram-negativas, 24 apresentaram forma de bacilo e apenas 1 isolado apresentou forma de cocos, conforme a tabela 1.

Tabela 1. Número de bactérias isoladas e suas características morfológicas

Isolados bacterianos das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 Estação Seca e Chuvosa		
Morfologia bacteriana	Número de Isolados	%
Bacilo Gram-Negativo	24	47,05
Bacilo Gram-Positivo	25	45,09
Coco Gram-Negativo	1	1,96
Coco Gram-Positivo	3	5,88
Total:	53	100

Neste estudo, foi realizada uma análise do perfil de resistência a 12 antimicrobianos dos isolados bacterianos cavernícolas, ao longo de duas diferentes estações: seca e chuvosa. A escolha de realizar a análise em duas diferentes estações foi fundamentada na necessidade de compreender melhor a dinâmica da suscetibilidade antimicrobiana em ambientes com variações sazonais significativas. A estação seca e chuvosa representa condições ambientais distintas, que podem influenciar a ecologia microbiana em diferentes aspectos. Os dados obtidos foram organizados com base nas características morfológicas das amostras, baseadas na técnica de coloração de Gram, visto que, dados taxonômicos ainda estão em processo de análise.

Tabela 2. Perfil de Resistência bacteriana dos isolados da Caverna GEM-1462 e GEM-1423 aos antimicrobianos testados

Bactérias testadas	Nº de amostras	%	Número de bactérias resistentes aos antimicrobianos											
			AMO	NAL	AMP	CLO	CIP	EST	GEN	IPM	NOR	TRI	TET	SUT
ESTAÇÃO SECA														
GEM-1462														
Bacilo Gram-Positivo	11	68,75	4	2	6	3	1	1	-	4	-	4	2	4
Bacilo Gram-Negativo	5	31,25	3	1	2	1	-	-	-	1	-	3	1	1
Coco Gram-Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coco Gram-Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	16	100	7	3	8	4	1	1	-	5	-	7	-	5
ESTAÇÃO CHUVOSA														
GEM-1462														
Bacilo Gram-Positivo	7	50	6	2	4	-	1	-	-	2	1	6	2	3
Bacilo Gram-Negativo	4	28,57	4	1	4	-	1	-	1	3	1	3	1	-
Coco Gram-Positivo	2	14,28	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Coco Gram-Negativo	1	7,14	1	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	-
Total	14	100	12	4	10	-	2	1	1	5	2	11	4	3
ESTAÇÃO SECA														
GEM-1423														
Bacilo Gram-Positivo	1	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1
Bacilo Gram-Negativo	8	88,88	4	-	3	1	-	1	1	4	1	2	2	2
Coco Gram-Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coco Gram-Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	9	100	4	-	3	1	-	-	-	4	2	3	2	3
ESTAÇÃO CHUVOSA														
GEM-1423														
Bacilo Gram-Positivo	6	42,85	2	1	3	-	1	1	-	3	2	6	2	-
Bacilo Gram-Negativo	7	50	4	-	3	-	1	1	-	3	1	5	-	-
Coco Gram-Positivo	1	7,14	-	1	1	-	1	-	-	-	1	1	1	1
Coco Gram-Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	14	100	6	2	7	-	3	2	-	6	4	12	3	1

AMO: Amoxicilina; NAL: Ácido nalidíxico; AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Cloranfenicol; EST: Estreptomina; IPM: Imipenem; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacina; TRI: Trimetoprima; SUT: Sulfazotrim; TET: Tetraciclina.

Os resultados revelaram semelhanças entre os perfis de resistência dos isolados, colaborando com informações valiosas sobre a dinâmica das bactérias nas cavernas em diferentes condições ambientais. No que diz respeito à caverna GEM-1462 durante a estação seca, um total de 16 bactérias foram testadas. Dentre essas, 43,7% bactérias demonstraram um perfil de resistência a Amoxicilina e Trimetoprima e 50% à Ampicilina, enquanto 31,2% demonstraram resistência ao Sulfazotrim, e Imipenem, esses foram os antimicrobianos aos quais as bactérias apresentaram maior resistência.

Foi observado que, durante a estação seca, as bactérias provenientes da caverna GEM-1462 demonstraram suscetibilidade à Ciprofloxacina e Norfloxacina, ambos pertencentes ao grupo de antimicrobianos das quinolonas, assim como à Gentamicina,

que faz parte da classe dos aminoglicosídeos. Esses resultados sugerem que, apesar da prevalência de resistência a diversos antimicrobianos, a classe das quinolonas e aminoglicosídeos demonstraram sua eficácia frente aos isolados da caverna GEM-1462.

Na caverna GEM-1462, estação chuvosa, foi observado maior resistência entre as bactérias avaliadas. Um total de quatorze bactérias foram testadas, sendo que verificada uma maior resistência a Amoxicilina e Trimetoprima (85,7%), seguido da Ampicilina (71,4%). No entanto, a Ciprofloxacina, o Cloranfenicol e a Gentamicina mostraram-se eficazes contra a maioria das bactérias isoladas desta caverna. Esses resultados indicam uma persistência na resistência aos antimicrobianos de maior espectro e a eficácia contínua das quinolonas e aminoglicosídeos.

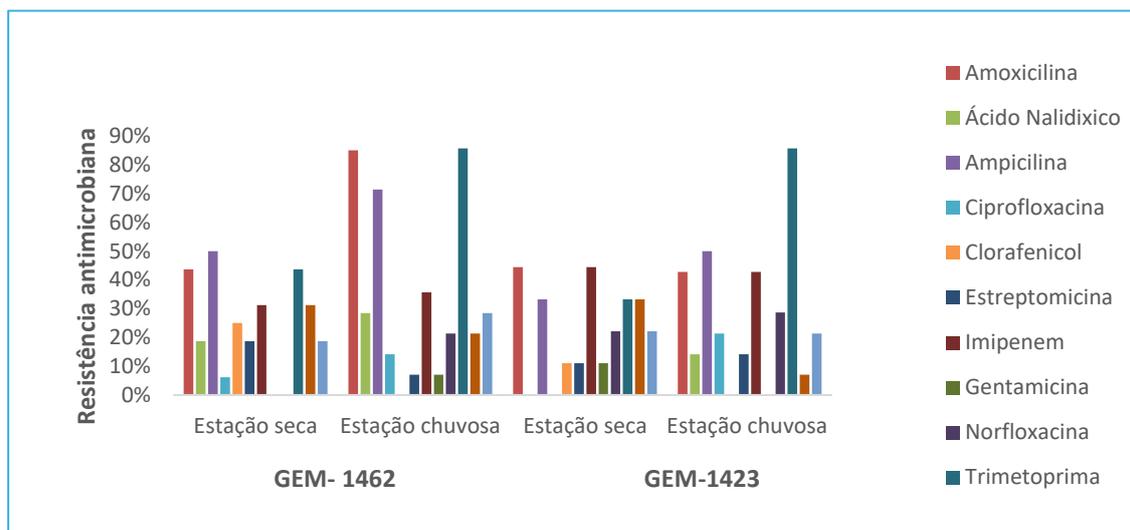
Observou-se uma tendência no perfil de resistência aos mesmos antimicrobianos, em ambas as estações. Sendo assim, 68,7% das bactérias da estação seca apresentaram resistência a pelo menos 2 antimicrobianos, enquanto na estação chuvosa, esse número foi maior, sendo 92,8%. Essa variação de estação pode ser sugestiva de que as bactérias são mais adaptadas a ambientes úmidos, estando correlacionado com a expressão de genes que conferem resistência a antimicrobianos.

Da Caverna GEM-1423 na estação seca, um total de 9 bactérias foram testadas, 44,4% das bactérias apresentaram resistência tanto à Amoxicilina quanto à Imipenem, enquanto 33,3% mostraram resistência à Trimetoprima e Ampicilina. Na Caverna GEM-1423 durante a estação seca, todas as bactérias exibiram suscetibilidade ao Ácido Nalidíxico e Ciprofloxacina, e a maioria a Gentamicina, Cloranfenicol e Estreptomicina. Na estação chuvosa, observou-se uma prevalência de resistência quando comparada a estação seca. Das quatorze bactérias testadas, 42,8% demonstraram resistência à Amoxicilina e 50% à Ampicilina, além disso, 85,7% bactérias foram resistentes à Trimetoprima. As bactérias da Caverna GEM-1423 da estação chuvosa apresentaram suscetibilidade à Cloranfenicol e Gentamicina, semelhantes ao observado na estação seca.

Um ambiente cavernícola é um objeto de estudo importante para compreensão de como ambientes que não foram expostos ao uso de antimicrobianos humanos, fornecem uma diversidade genética de resistência intrigante para a compreensão da prevalência de genes de resistência e sua relação com a evolução.

De modo geral, 80% das bactérias são resistentes a pelo menos dois antimicrobianos (Figura 2), apresentando um padrão de resistência semelhante ao observado por Çandiroğl & Güngö (2020) na caverna Parsik, na Turquia. Ambas as cavernas do nosso estudo, apresentaram elevada resistência à Trimetoprima, semelhante ao observado por Bhullar et al. (2012), em 60% das bactérias isoladas de caverna da Lechuguilla, localizada no Estado do Novo México (EUA), e em isolados de cavernas de Ônix dos Estados Unidos (Lavoie, 2017). Além disso, as bactérias também apresentaram elevada resistência a Ampicilina e a Amoxicilina, ambos pertencentes à classe das penicilinas, corroborando as descobertas de Bhullar et al. (2012) no Estado do Arizona, e Turrini et al. (2020), na caverna do rio Yumugi, na Nova Guiné. Na nossa pesquisa, foi observado semelhança entre os isolados de ambas as cavernas, nas duas estações, quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos Trimetoprima, Amoxicilina e Ampicilina, corroborando com informações valiosas sobre a dinâmica das bactérias em diferentes condições ambientais.

Figura 2. Comparação dos perfis de resistência antibacteriana entre os isolados nas estações seca e chuvosas das cavernas ferríferas GEM-1462 e GEM-1423 do Pará, Brasil



Os elevados índices de resistência a antimicrobianos observados pode estar relacionado com o ambiente, visto que cavernas ferríferas têm como característica ser um ambiente muito suscetível as ações de intemperismo, alto índice de umidade além do depósito do minério. Lavoie (2017) traz como hipótese que essas características das cavernas agregam estresse adicional, resultando no aumento da produção de antimicrobianos para reduzir a competição ou aumentar a predação.

Em contraste, as bactérias apresentaram maior suscetibilidade a classe das quinolonas (Ciprofloxacina e Norfloxacina) e aminoglicosídeo (Gentamicina), que mantiveram sua eficácia ao longo das estações, sugerindo uma resistência menos impactante a esses antimicrobianos, independentemente das variações sazonais.

Após a análise das duas cavernas, observou-se diferenças relevantes em relação à resistência antibacteriana dos isolados bacterianos testados, nas estações seca e chuvosa. Foi observado que as bactérias, em ambas as cavernas apresentam maior perfil de resistência na estação chuvosa. Provavelmente, esse comportamento está relacionado ao isolamento de maior número de cepas bacterianas durante a estação chuvosa, indicando uma possível correlação entre o aumento da diversidade microbiana e a expressão de genes de resistência. Além disso, a umidade elevada e as condições de temperatura durante a estação chuvosa, podem proporcionar um ambiente propício para o desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos, contribuindo assim para o aumento do perfil de resistência observado nesse período.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, a investigação do perfil de resistência antibacteriana em ambientes de cavernas ferríferas, oferece insights valiosos sobre a adaptação microbiana em ambientes extremos. Os padrões de resistência e suscetibilidade observados nas cavernas ao longo das estações, seca e chuvosa, destacam a complexidade das interações entre os microrganismos e as variações ambientais sazonais. A descoberta de diferentes perfis de resistência bacteriana aos antimicrobianos de amplo espectro em ambientes inóspitos,

destaca a capacidade adaptativa das bactérias em ambientes desafiadores e reforça a importância da vigilância e pesquisa contínuas para compreender a dinâmica da resistência antimicrobiana em contextos diversos. Além disso, a eficácia contínua das quinolonas e aminoglicosídeos, em ambos os ambientes, sugere um potencial para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. A análise da microbiota em ambientes extremos como cavernas ferríferas contribui para a compreensão da diversidade microbiana, e oferece perspectivas promissoras para a pesquisa biotecnológica. Esse estudo ressalta a relevância da conservação desses ambientes naturais, não apenas pela sua importância geológica, mas também pelo potencial que oferecem para a descoberta de soluções antimicrobianas inovadoras.

REFERÊNCIAS

- [1] AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja; PETRIČ, Patricia; PAŠIĆ, Lejla. Screening the cultivable cave microbial mats for the production of antimicrobial compounds and antibiotic resistance. **International Journal of Speleology**, v. 48, n. 3, p. 9, 2019.
- [2] BAUER, A.W.; KIRBY, E.; SHERRIS, E.M.; TURK, M. Antibiotic by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45, p.493-496, 1996
- [3] BHULLAR, Kirandeep et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34953, 2012.
- [4] ÇANDIROĞLU, B.; GÜNGÖR, N. The Biotechnological Potentials of Bacteria Isolated from Parsik Cave, Turkey: Measuring the enzyme profiles, antibiotic resistance and antimicrobial activity in bacteria. **Johnson Matthey Technology Review**, v. 64, n. 4, p. 466-479, 2020.
- [5] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Twenty-Eighth Edition: M100. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018
- [6] LAVOIE, K., RUHUMBIKA, T., BAWA, A., WHITNEY, A., & DE ONDARZA, J. High levels of antibiotic resistance but no antibiotic production detected along a gypsum gradient in great Onyx Cave, KY, USA. **Diversity**, 9, n. 12, 1-10, 2017.
- [7] PILÓ, L. B. **Diagnóstico e análise de relevância das cavernas da Serra da Bocaina**. Belo Horizonte: Carste Consultores Associados, 179, 2014.
- [8] TRAJANO, E. & BICHUETTE, M. Biologia subterrânea: introdução. **Redespeleo**: São Paulo, 2006
- [9] TURRINI, P., TESCARI, M., VISAGGIO, D., PIROLO, M., LUGLI, G. A., VENTURA, M., VISCA, P. The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. **Microbiological Research**, 241, 126584, 2020.

Capítulo 2

Extratos vegetais: uma perspectiva comparativa entre métodos de extração clássicos e modernos

Adriá Braun Vieira¹

Camila Vogt dos Santos²

Debora Marina Bandeira³

Débora Pedroso⁴

Jéssica Rosset⁵

Mayara Maria de Souza⁶

Fabiana Gisele da Silva Pinto⁷

Resumo: Os extratos vegetais, sendo preparações líquidas ou em pó, apresentam diversas atividades biológicas e encontram aplicação em diversos setores, como alimentício, farmacêutico e outros. A obtenção desses extratos pode ser realizada por meio de diferentes métodos, os quais desempenham um papel crucial na extração dos compostos bioativos, impactando diretamente no rendimento final do processo. Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi comparar métodos de extração tradicionais: infusão, decocção, destilação a vapor, maceração e soxhlet, e métodos modernos: extração por fluido supercrítico (EFS), extração por líquido pressurizado (ELP), extração com água subcrítica (EAS), extração aquosa assistida por enzimas (EAAE), extração assistida por ultrassom (EAU), e extração assistida por micro-ondas (EAM), encontrados na literatura, e apresentar algumas vantagens e desvantagens, além de ressaltar os impactos ambientais.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Métodos de extração. Compostos bioativos.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/ Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0006-9133-3784>

² Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-7566-8003>

³ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-5956-7210>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0004-0856-4916>

⁵ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-8348-0649>

⁶ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0000-0444-1442>

⁷ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>

1. INTRODUÇÃO

A busca por compostos bioativos de origem natural sempre foi realizada pelo homem desde a antiguidade com o processamento de ervas ou preparo de chás com o intuito de aplicação à saúde e permanece até os dias atuais (Soares et al., 2016). A seleção das plantas para a obtenção de bioativos pode acontecer de forma estratégica como a zoofarmacognosia quando os animais procuram plantas para solução de seus problemas de saúde, por ecologia química quando se observa as inter-relações ecossistêmicas, por exemplo a defesa produzida pela planta quando é atacada por algum inseto ou fungo, por coletas randômicas na procura prioritariamente de plantas endêmicas, por quimiotaxia quando se demonstra características parecidas de acordo com a família ou gênero, ou por conhecimento popular como é o caso das plantas medicinais devido às indicações terapêuticas, ou seja elas possuem propriedades químicas específicas, ou seja, um elevado número de metabólitos secundários e bioativos (Carlini; Mendes, 2011).

Após a escolha da planta, é importante que ela passe por procedimentos iniciais antes da extração como a identificação botânica, separação de folhas, caules e frutos, limpeza, e caso a intenção seja conseguir o pó da planta, esta deve passar por posterior secagem e trituração, gerando uma biomassa vegetal seca que facilitará sua incorporação nos métodos de extração (Soares et al., 2016).

Os extratos vegetais consistem em preparações líquidas ou em pó derivadas de diversas partes das plantas, como raiz, caule, folhas, flores ou frutos, que contêm compostos com atividade biológica. Esses compostos são produzidos pelas plantas e podem ser extraídos por meio de diversas metodologias. A definição ou adaptação dos extratos ocorre em consonância com a propriedade química que se pretende extrair de cada planta, estando diretamente ligada à solubilidade de cada molécula ativa, conforme indicado por Marques (2005).

O preparo dos extratos vegetais pode ocorrer por diferentes métodos, dos clássicos como o soxhlet, à modernos como extração por fluido supercrítico (EFS), extração assistida por ultrassom (EAU), extração por líquido pressurizado e outros que buscam primordialmente eficiência e sustentabilidade (Sousa; Gasparoti; Paula, 2022). Na seleção do método de extração apropriado, é fundamental ponderar elementos como a eficácia da extração, a estabilidade das substâncias envolvidas, a disponibilidade dos meios, os custos do processo e a finalidade do extrato (Oliveira, 2020).

Se houver uma molécula alvo específica de interesse, torna-se mais evidente a seleção do método de extração apropriado e, conseqüentemente, a aplicação subsequente do extrato. No entanto, o desafio surge quando a busca por novas moléculas não dispõe de um alvo predefinido, exigindo, assim, a prospecção desses bioativos (Soares et al., 2016; Siqueira et al., 2020; Rodrigues, 2020; Dias, 2020). O processo de separação de compostos pode ser realizado a frio ou quente, e também pode envolver a utilização de solventes como água e etanol, e alguns considerados tóxicos que devem ser utilizados com menor frequência ou até mesmo evitados de acordo com os princípios da química verde, são eles, acetoneitrila, metanol, hexano, clorofórmio e outros (Tsukui; Rezende, 2014).

Este estudo, embasado na busca milenar por compostos bioativos de origem natural, destaca a importância contínua da investigação sobre os métodos de extração de extratos vegetais. Desde práticas ancestrais de processamento de ervas até abordagens contemporâneas de zoofarmacognosia e ecologia química, a seleção criteriosa de plantas e a aplicação de métodos eficazes de extração tornam-se cruciais. A identificação botânica, preparo da biomassa vegetal, escolha de solventes e a aplicação de métodos extrativos

variados, como extração por fluido supercrítico (EFS) e extração assistida por ultrassom (EAU), representam etapas cruciais nesse processo.

As vantagens desses métodos incluem a maximização da eficiência extrativa, obtenção de concentrações elevadas de metabólitos secundários e antioxidantes, além de considerações ambientais, refletindo princípios da química verde. No entanto, é imperativo reconhecer as desvantagens, como a escolha adequada de solventes para evitar compostos considerados tóxicos e ponderar elementos como custos, estabilidade das substâncias envolvidas e a finalidade do extrato (Oliveira et al., 2016).

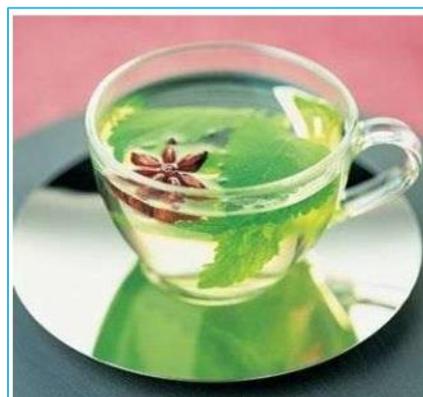
Nesse contexto, a prospecção de bioativos torna-se um desafio, exigindo uma abordagem mais ampla e exploratória. Em última análise, o estudo destaca a relevância de métodos extrativos eficientes para otimizar a concentração de ativos potenciais, contribuindo assim para avanços significativos na pesquisa de compostos bioativos de origem vegetal.

2. METODOS TRADICIONAIS

2.1. INFUSÃO

A infusão é um procedimento de extração direta, no qual o material entra em contato com água fervente, dispensando a necessidade de equipamentos ou vidrarias especializadas. Como sua maior vantagem está a simplicidade do método e como desvantagem a baixa extração de metabólitos, pois não são solubilizados todos os compostos (Oliveira, 2020) (Figura 1).

Figura 1 – Processo de infusão de folha e fruto



Fonte: Kempes et al. (2014).

2.2. DECOCCÃO

Assim como a infusão, este método tem como base o contato direto do material vegetal com a água, o único detalhe é que eles devem ferver juntos, sendo indicado principalmente para cascas ou partes duras da planta (Oliveira, 2020). O processo tem como base a ebulição, e isso é uma desvantagem, pois gera a perda de compostos termosensíveis, mas ele é muito utilizado no preparo de chás (Kempes et al. 2014) (Figura 2).

Figura 2 – Processo de decocção de folhas



Fonte: Kempes et al. (2014).

2.3. DESTILAÇÃO A VAPOR

É um processo de separação de substâncias baseado na diferença dos pontos de ebulição. Neste método os compostos são extraídos por arraste a vapor, servindo principalmente para os compostos insolúveis em água, voláteis ou com sensibilidade térmica (Oliveira, 2020). Sendo assim, é muito utilizado na extração de óleos essenciais (Busato et al., 2014) (Figura 3).

Figura 3 – Extrator por destilação a vapor



Fonte: Coelho (2012).

2.4. MACERAÇÃO

Este método pode ocorrer em condições a frio ou quente e baseia-se em contato estático ou dinâmico do solvente com a planta (Marques, 2005). A maceração dinâmica consiste em submeter o material vegetal e o solvente em agitação, seja por shaker, liquidificador ou algum outro equipamento durante um período de tempo determinado (Garcia et al., 2019; Torres et al. 2022) (Figura 4).

Figura 4 – Maceração de folhas em cadinho para extração de compostos ativos



Fonte: Kempes et al. (2014).

2.5. SOXHLET

Este método pode ser classificado como um processo extrativo exaustivo e altamente eficiente, pois se assemelha a uma percolação cíclica com destilação. Uma vantagem do método é a possibilidade de reutilização do solvente por rotaevaporador. Porém tem como desvantagens “o alto consumo energético, tempo elevado de extração e limitação de uso em materiais com compostos termolábeis, devido ao aquecimento contínuo do extrato no reservatório de solvente” (Sousa; Gasparoti; Paula, 2022, p. 2).

No preparo do extrato é preciso pesar a biomassa seca da planta e colocá-la em um cartucho de papel filtro. Depois disso adicionar o solvente no balão que vai ser encaixado ao Soxhlet (Figura 1). Essa extração a quente acontece a partir do aquecimento do solvente por meio de uma manta térmica, ele evapora e passa por resfriamento de modo a condensar, formando gotas que passam pela biomassa seca e retornam ao sistema de aquecimento formando ciclos (Figura 5).

O sistema de extração por Soxhlet foi desenvolvido em 1879 e tem sido utilizado como um método de extração laboratorial há mais de um século, mesmo assim, continua sendo uma referência frente ao desempenho dos métodos de extração modernos (Castro; Priego-Capote, 2010; Sousa; Gasparoti; Paula, 2022).

Figura 5 - Extrator Soxhlet



Fonte: A autora (2023).

3. METODOS MODERNOS

3.1. EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (EFS)

Este método se baseia em alcançar o ponto crítico de uma substância pura, ou seja, em que a temperatura e a pressão estejam em estado crítico, fazendo com que a densidade seja a mesma tanto na fase líquida quanto na gasosa, e possa ser controlada sem cruzar o limite de fases (Sousa; Gasparoti; Paula, 2022). Este procedimento também tem sido utilizado na extração de compostos vegetais, devido à sensibilidade que estes princípios ativos possuem em relação às variações de temperatura, e à alta pureza alcançada durante o processo de extração (Contado et al., 2010) (Figura 6).

Tem como vantagens a redução do tempo de extração, aumento do rendimento do extrato, inclusive com a possibilidade de escolher os compostos a serem separados por meio da mudança das condições de temperatura e a pressão, e reciclagem do solvente (Contado et al., 2010; Sousa; Gasparoti; Paula, 2022).

Figura 6 - Extrator por fluido supercrítico



Fonte: Directindustry (2023).

3.2. EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO (ELP)

Este método consiste na alta pressão, que vai manter o solvente em sua forma líquida, mesmo que a temperatura tenha atingido o limite para mudança de fase para vapor. Como vantagem é possível manter compostos termicamente sensíveis e devido a sua eficiência vem sendo utilizado na obtenção de extratos vegetais enriquecidos com bioativos (Rodrigues, 2020) (Figura 7). No processo há o aumento na solubilidade dos compostos e a melhora nas taxas de transferência de massa, que facilitam o acesso do solvente a áreas que normalmente não estariam acessíveis por métodos de extração tradicionais. Tem como vantagem a extração dos compostos de forma mais rápida, e como desvantagem o alto custo de investimento no equipamento (Cunha et al., 2020).

Os métodos de alta pressão como o ESF e ELP possuem o conceito de tecnologia verde, ou seja, cumprem alguns quesitos da química verde, pois utilizam no geral solventes como o etanol, a água e o CO₂ que não trazem consequências maléficas ao meio ambiente (Torres et al., 2021).

Figura 7 - Extrator por líquido pressurizado

Fonte: Raykol (2023).

3.3. EXTRAÇÃO COM ÁGUA SUBCRÍTICA (EAS)

Este método se baseia em manter a água em seu estado líquido sob condições de alta pressão e uma temperatura elevada entre 100°C e 374°C, é muito parecido com o que acontece no ELP (Sousa; Gasparoti; Paula, 2022). No processo, a temperatura vai ser o fator chave para controlar a extração dos bioativos. Tem como vantagem a redução do tempo de extração e a substituição do uso de solventes tóxicos (Souza; Souza; Oliveira, 2022).

3.4. EXTRAÇÃO AQUOSA ASSISTIDA POR ENZIMAS (EAAE)

Este método se baseia na utilização de enzimas que promovem a degradação das paredes celulares das plantas para a liberação de compostos bioativos, e além da degradação, também estarão envolvidas na catálise de algumas reações (Heemann et al., 2019).

O processo realiza a extração de compostos e óleo mesmo sendo uma extração aquosa sem a necessidade de condições extremas como em EFS, ELP, e EAS. Algumas enzimas envolvidas nesse processo são celulases, pectinases e proteases. Tem como vantagens o menor uso de solvente e energia, e a obtenção de um produto refinado (Souza; Souza; Oliveira, 2022).

3.5. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU)

O ultrassom é um tipo de onda eletromagnética com 20 kHz, que vai além da frequência auditiva humana. Essa extração acontece por ondas ultrassônicas em alta potência que podem provocar rupturas nos tecidos vegetais, colocando seus componentes em contato com o solvente. Ele é uma ótima escolha em relação aos outros métodos

modernos, pois possui menor custo de equipamento (Sousa; Gasparoti; Paula, 2022). As ondas se propagam pelo solvente formando microbolhas com tamanhos diferentes que se soltaram, o rompimento dessas bolhas resulta na criação de intensas forças de cisalhamento no meio, o que leva ao aumento da permeabilidade dos tecidos vegetais e resulta em uma maior solubilização dos compostos ativos (Silva, 2022).

Na extração entre sólido e líquido ocorre um aumento na transferência de massa, além disso, o processo pode ser realizado em baixa temperatura, ocasionando a otimização do processo com aumento de rendimento, diminuição do uso de solvente e diminuição da degradação de compostos bioativos pela temperatura (Passos, 2022).

O equipamento consiste em um controlador, um conversor, e uma sonda/ponteira, sendo esta última a parte que entra em contato direto com o material vegetal e o solvente (Figura 8). Ambos são colocados ao mesmo tempo em um reator de vidro encamisado e acoplado a um banho termostato que faz o controle da temperatura, onde a sonda é inserida em profundidade.

Figura 8 - Extrator ultrassônico tipo sonda com ponteira



Fonte: A autora (2023).

Além deste equipamento, também é possível realizar a extração de maneira indireta por meio do banho ultrassônico. Este método possui como vantagens o curto tempo de extração, facilidade de operação e boa capacidade de solubilização dos compostos independente do solvente utilizado, demonstrando significativa importância para futuros estudos e aplicações tanto na esfera científica quanto na industrial (Silva, 2022).

3.6. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS (EAM)

Este método de aquecimento por micro-ondas está ligado a princípios físicos e químicos que relacionam temperatura, estrutura molecular, ligação química, polarização e outros. E, envolve a rotação de dipolo e a condução iônica, ocorrendo de forma contrária ao aquecimento convencional, de modo a aquecer primeiramente o interior do material. “A irradiação de micro-ondas trabalha na faixa de frequência entre 0,3 a 300 GHz e comprimento de onda (λ) variando entre 1 mm e 1 m.” (Tsukui; Rezende, 2014, p. 1716) (Figura 9).

Tem como vantagens eficiência dos resultados quando comparados aos métodos de soxhlet e ultrassom, etapas reduzidas no preparo de amostra, redução do tempo de extração, e geração de pequena quantidade de resíduos (Tsukui; Rezende, 2014).

Figura 9 - Extrator por micro-ondas



Fonte: Superlab (2023).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, os métodos de extração apresentados abrangem uma variedade de abordagens, cada uma com suas vantagens e desvantagens distintas. A infusão, por sua simplicidade e dispensa de equipamentos especializados, destaca-se pela facilidade de implementação. No entanto, sua desvantagem reside na baixa extração de metabólitos, pois não solubiliza todos os compostos.

A decocção, similar à infusão, baseia-se no contato direto do material vegetal com a água, mas, neste caso, ocorre a fervura conjunta. Embora seja indicada para cascas ou partes duras da planta, a desvantagem reside na perda de compostos termosensíveis devido à ebulição.

A destilação a vapor utiliza a diferença nos pontos de ebulição para extrair compostos insolúveis em água, voláteis ou termosensíveis, sendo comumente empregada na extração de óleos essenciais. Sua principal vantagem está na aplicação a

compostos específicos, enquanto a desvantagem está na limitação de uso para substâncias insolúveis em água.

A maceração, seja a frio ou a quente, envolve o contato estático ou dinâmico do solvente com a planta. A maceração dinâmica, em particular, utiliza agitação durante um período determinado. Vantagens incluem a versatilidade, mas desvantagens podem surgir na eficiência em comparação com métodos mais avançados.

O método Soxhlet, apesar de ser um processo extrativo exaustivo e eficiente, enfrenta desafios como alto consumo energético, tempo elevado de extração e limitação de uso em materiais com compostos termolábeis. No entanto, sua vantagem está na reutilização do solvente.

Os métodos modernos, como a extração por fluido supercrítico (EFS), oferecem vantagens como redução do tempo de extração, aumento do rendimento do extrato e reciclagem do solvente. A extração por líquido pressurizado (ELP), embora permita a manutenção de compostos termicamente sensíveis, enfrenta desafios relacionados ao alto custo de investimento.

A extração com água subcrítica (EAS) reduz o tempo de extração e substitui o uso de solventes tóxicos, enquanto a extração aquosa assistida por enzimas (EAAE) utiliza enzimas para degradar as paredes celulares das plantas, reduzindo o uso de solvente e energia.

A extração assistida por ultrassom (EAU) proporciona vantagens como aumento na transferência de massa, menor degradação de compostos bioativos pela temperatura e menor custo de equipamento. O método de extração assistida por micro-ondas (EAM) destaca-se pela eficiência comparada a métodos convencionais, redução de etapas no preparo da amostra e geração de menos resíduos. Cada método apresenta trade-offs específicos, e a escolha entre eles dependerá da natureza dos compostos alvo, dos objetivos da extração e das condições específicas do experimento.

Todos os métodos possuem vantagens e desvantagens que devem ser levados em questão na busca por compostos bioativos, mas é importante manter o aprimoramento durante o seu procedimento, e o cuidado com a escolha e uso dos solventes. É importante seguir buscando avanços tecnológicos que permitam o desenvolvimento de metodologias mais eficientes, seguras, baratas e sustentáveis, que aumentem o rendimento dos bioativos sem deixar de pensar no impacto causado ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- [1] BUSATO, N. V. et al. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1574-1582, 2014.
- [2] CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolo em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC com ênfase nas plantas medicinais**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.
- [3] CASTRO, M. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 2010.
- [4] COELHO, P. Destilação por arraste de vapor: Funcionamento, Usos, e Vantagens do processo. 2012. Disponível em <<https://www.engquimicasantosp.com.br/2012/03/destilacao-com-arraste-de-vapor.html>> Acesso em 13 novembro 2023.
- [5] CONTADO, E. W. N. F. et al. Estudo dos métodos de extração de carotenóides em cenoura por fluido supercrítico (efs) e convencional. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1617-1623, 2010.

- [6] CUNHA, E. S. L. et al. Extração com líquido pressurizado: montagem de uma unidade multipropósito laboratorial e desenvolvimento de um procedimento operacional padrão (POP). **Revista Brasileira de Iniciação Científica (RBIC)**, v. 7, n.6, p. 134-149, 2020.
- [7] DIRECTINDUSTRY. Disponível em < <https://www.directindustry.com/pt/prod/waters/product-36060-1766482.html> > Acesso em 13 novembro 2023.
- [8] DIAS, F. G. B. Determinação de propriedades biológicas e prospecção fitoquímica dos extratos das folhas de *physalis angulata* L., silvestre e cultivada. 89 f. Dissertação de mestrado (Mestre em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Ceará, 2020.
- [9] GARCIA, J, A, A. et al. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest, *Food Chemistry*, V, 294, p, 302–308, 2019.
- [10] HEEMANN, A. C. W. et al. Extração de polifenóis de erva-mate verde assistida por enzimas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.
- [11] KEMPES, N. F. et al. Extração simplificada dos princípios ativos do capim limão, *Cymbopogon citratus*. **Anais do II Encontro PIBID/CAPES/FAI**, Adamantina, 2014.
- [12] MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 71-74, 2005.
- [13] OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por claudação de *Dicksonia sellowiana* (presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.18, n.1, p.230-239, 2016.
- [14] OLIVEIRA, L. F. Eficiência dos métodos de extração para obtenção de lactonas sesquiterpênicas: uma revisão sistemática. 65 f. Monografia de graduação (Bacharel em Engenharia Química) - Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Feira de Santana, 2020.
- [15] PASSOS, F. R. **Extração e processamento de folhas de *Pereskia aculeata* Miller empregando tecnologia verde**. 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Engenharia química) – Campus Toledo, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo-PR, 2022.
- [16] RAYKOL. Disponível em < <https://pt.raykolgroup.com/products/pressurized-fluid-extraction/> > Acesso em 13 novembro 2023.
- [17] RODRIGUES, L. C. Obtenção de tintura de folha de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) com extração por líquido pressurizado: estudo da cinética de extração, aumento de escala e análise econômica. Dissertação de mestrado (Mestre em engenharia de alimentos) - Universidade de São Paulo, 2021.
- [18] RODRIGUES, F. C. Prospecção fitoquímica e bioatividade de *Sida galheirensis* ulbr. (Malvaceae). 126 f. Dissertação de mestrado (Mestre em Biologia vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, 2020.
- [19] SILVA, B. M. **Avaliação da composição e do rendimento global dos extratos vegetais do ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) oriundos de diferentes métodos de extração**. 2022. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.
- [20] SIQUEIRA, J. S. et al. Prospecção fitoquímica e avaliação dos potenciais citotóxico e antioxidante do extrato das folhas de *Microgramma vaccinnifolia*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n.4, p. 20318-20331, 2020.
- [21] SOARES, N. P. et al. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia biosfera**, v.13, n.24, p.991-1010, 2016.
- [22] SOUSA, R. R; GASPAROTI, P. S.; PAULA, J. A. M. Obtenção de extratos de plantas medicinais: uma revisão de escopo dos métodos extrativos modernos em comparação ao método clássico por soxhlet. **Revista Movimenta**, v.15, n.1, p. 1-14, 2022.
- [23] SOUZA, A. G.; SOUZA, E. S.; OLIVEIRA, E. R. **Óleo de farelo de arroz: características, métodos de extração e aplicações na indústria**. 45 f. Trabalho de Graduação (Tecnólogo em processos químicos) - Faculdade de Tecnologia de Campinas, Campinas, 2022.

- [24] SUPERLAB. Disponível em < <https://www.superlab.com.br/marsx> > Acesso em 13 novembro de 2023.
- [25] TORRES, T. M. S. et al. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 179, 2021.
- [26] TORRES, R. R. A. Evaluación preliminar de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de las hojas de *Pereskia aculeata* Mill. 2022.
- [27] TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração assistida por micro-ondas e química verde. **Revista virtual de química**, v. 6, n. 6, p. 1713-1725, 2014.

Capítulo 3

Combatendo a ameaça da Salmonella na avicultura: o potencial de óleos essenciais e extratos vegetais como alternativas sustentáveis

*Camila Vogt dos Santos*¹

*Mayara Maria de Souza*²

*Andressa Guarnieri Canton*³

*Debora Marina Bandeira*⁴

*Fabiana Gisele da Silva Pinto*⁵

Resumo: A avicultura no Brasil ocupa uma posição preeminente na indústria alimentar, destacando-se como um dos pilares fundamentais em termos de produção e exportação global de carne de frango. Contudo, esse crescimento não está isento de desafios, notadamente a ameaça representada pelo patógeno *Salmonella*, uma bactéria amplamente prevalente na indústria avícola. A presença desta bactéria impõe consideráveis ramificações para a saúde pública e a produção animal. A resistência a antimicrobianos, é agravada pelo uso exagerado desses compostos na avicultura, tanto para o tratamento as aves, quanto como promotores de crescimento. A capacidade de adaptação bacteriana reduz a eficácia dos tratamentos, representando um desafio significativo tanto para saúde animal quanto a humana. Como alternativa aos antimicrobianos convencionais, a busca por produtos naturais (extratos vegetais e óleos essenciais) tem ganhado destaque. A presente revisão bibliográfica tem como objetivo destacar estudos que evidenciam a eficácia de óleos essenciais e extratos vegetais no combate a diferentes sorovares de *Salmonella enterica*, representando uma alternativa promissora e menos prejudicial à saúde, além de constituir uma abordagem mais segura e sustentável para a avicultura.

Palavras-chave: Avicultura. Extratos vegetais. Óleos essenciais. *Salmonella* spp.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-7566-8003>

² Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0000-0444-1442>

³ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-4627-4985>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-5956-7210>

⁵ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos em território brasileiro tem dimensões continentais e está entre as maiores do mundo. A avicultura no país cresceu muito nas últimas décadas, isso devido as inovações na sua tecnologia de produção. O Brasil está em posição de destaque mundial no mercado de carnes internacional, desde 2013 ocupa as primeiras posições em produção mundial (Barros, Geraldo Junior, 2023). Em 2022, o Brasil foi o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, produzindo 14,524 milhões de toneladas, totalizando um valor bruto de R\$112,1 bilhões. Em relação as exportações o Brasil ficou na primeira posição mundial, exportando cerca de 4,822 milhões de toneladas para 145 países diferentes, arrecadando US\$9,7 bilhões (ABPA, 2023).

No mercado externo, o Brasil se destaca devido ao melhoramento genético, baixo custo de produção e a técnica de nutrição. A alimentação representa 70% dos custos de produção, sendo utilizados antimicrobianos como promotores de crescimento, permitindo ganho de peso e melhora da conversão alimentar das aves que vivem em sistemas intensivos, tornando mais rápido o tempo de produção (Rizzo et al., 2010). Com o aumento na produção deste setor, a taxa de infecção nas aves cresceu, sendo a carne de frango o principal veículo de transmissão de bactérias do gênero *Salmonella*. Além disso, o uso indiscriminado dos promotores de crescimento nessas aves promove a seleção de microrganismos resistentes (Souza et al., 2017; Mallmann et al., 2021).

A espécie *Salmonella enterica* é constituída por diversos sorovares, os quais são causadores da salmonelose, uma das principais zoonoses na indústria avícola, causando grandes perdas econômicas. Além disso, esses microrganismos conseguem sobreviver no trato intestinal dos animais sem causar doenças, trazendo sérias ameaças à inocuidade alimentar, uma vez que pode perpetuar no aviário pela transmissão vertical, que se dá através do ovo contaminado desencadeando nascimento de pintos doentes (Leonídeo et al., 2015; El-Saadony et al., 2022).

Tal doença ganha destaque também na saúde pública, pois causa intoxicação alimentar em humanos, podendo levar a óbito crianças e idoso. Isso ocorre, pois, o microrganismo causador da doença possui ampla distribuição e grande capacidade de sobrevivência por longos períodos no ambiente. A resistência bacteriana que esse microrganismo possui a uma grande variedade de antimicrobianos, é justamente o que limita o tratamento da doença tanto em animais quanto em humanos (Bona et al., 2010; Leonídeo et al., 2015; Vaz et al., 2015).

Diante disto, há uma preocupação com o uso contínuo de antimicrobianos nos aviários, tendo as indústrias buscado alternativas viáveis e mais seguras para a erradicação da *Salmonella* spp. (Paschoal, Luciano, Macedo, 2013). Uma escolha natural são bioativos oriundos das plantas, como extratos vegetais e óleos essenciais, estudos já mostram sua eficácia contra a resistência de microrganismos patogênicos, além de representar uma forma menos danosa ao consumidor, que estará livre das altas dosagens dos antimicrobianos sintéticos e possíveis danos à saúde (Pandini et al., 2015b).

Diante desse contexto, esta revisão bibliográfica ressalta a relevância de investigações envolvendo extratos vegetais e óleos essenciais, posicionando-os como uma alternativa viável para abordar a problemática da resistência de *Salmonella* spp. na indústria avícola.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AVICULTURA NO BRASIL E A SALMONELOSE

Até a década de 60 a avicultura no Brasil era conhecida apenas como uma produção familiar, carnes e ovos eram apenas para consumo próprio nas propriedades rurais. A partir de 1960 a avicultura passou a ter uma maior intensidade na sua produção, devido aos avanços tecnológicos, controle sanitário, melhoramento genético, etc. Mas apenas em 1970, o Brasil iniciou as exportações da carne de frango, foi quando o país se tornou um dos maiores exportadores mundiais, se mantendo até hoje nas primeiras posições com cerca de 4 milhões de toneladas de carne exportadas ao ano (Teixeira, Teixeira, 2021; Belusso, Hespagnol, 2010; ABPA, 2023).

Com a alta produção neste setor, a taxa de infecção das aves aumentou, sendo a carne de frango um importante veículo de transmissão da bactéria do gênero *Salmonella*, causadora da Salmonelose. Uma das principais ameaças na indústria das aves no mundo, a salmonelose é uma zoonose que causa mortalidade de pintos e embriões que estão associados aos sinais mais severos da doença (Mallmann et al., 2021). Diversos sorovares foram isolados de casos clínicos de aves como por exemplo, Typhimurium, Heidelberg, Enteritidis, Infantis, os sorovares Gallinarum e Pullorum são patogênicos e exclusivos de aves. Nos primeiros dias de vida as aves são mais suscetíveis, uma vez expostas ao patógeno, pode ser reservatório assintomático no ambiente ou desenvolverem a doença. No último caso, a infecção pode ser sistêmica, resultando em graves perdas econômicas na indústria avícola (Ibrahim et al., 2013; Souza et al., 2017; El-Saadony et al., 2022).

A infecção de galinhas por *Salmonella* sp. pode resultar em manifestações clínicas diversas. Devido à significativa relevância da Salmonela como agente causador de doenças em aves e como potencial risco para a saúde pública, essas manifestações são categorizadas em três grupos. No primeiro grupo se encontram os sorovares *S. Gallinarum* causadora do tifo aviários, e *S. Pullorum* que causa pulorose. Esses dois sorovares são imóveis e têm galinhas e perus como hospedeiros específicos e são considerados de alta patogenicidade. No segundo grupo estão incluídas salmonelas do tipo paratíficas, são consideradas móveis e representam cerca de 1500 sorovares, excluindo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. A infecção é chamada de paratifo aviário, dificilmente causam a doença clínica nas aves e em humanos essas salmonelas causam gastroenterites. Por fim, no grupo três são encontradas *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, consideradas bactérias móveis, ocasionalmente causam doença clínica em aves jovens. Na grande maioria dos casos, estão relacionadas com toxinfecções alimentares em humanos (Ourofino, 2017).

As salmonelas podem ser isoladas desde as fezes, órgãos internos até ovos e embriões de aves, tanto doentes quando portadoras sãs. Além disso, são também podem ser encontradas em cama de aviários, instalações, equipamentos, bem como alimento, matérias-primas, animais domésticos e silvestres. Um importante vetor na disseminação dos sorovares é o *Alphitobius diaperinus*, conhecido popularmente como “cascudinho”. Encontrado abundantemente nas instalações avícolas, levando a grandes prejuízos zootécnicos e sanitários na avicultura (Chernaki-Leffer et al., 2002; Ourofino, 2017). Ademais, os cascudinhos são espécies que se alimentam de carcaças, fungos, fezes, grãos e farinhas armazenadas. Dessa forma, tornam-se portadores e vetores de agentes patogênicos, principalmente devido aos seus hábitos alimentares. De acordo com a agroindústria brasileira, aproximadamente 60% dos casos de salmonelose em produções de frangos de corte são atribuídos a este vetor (Ourofino, 2017).

Além dos problemas nos aviários, a salmonelose apresenta-se como uma das maiores ameaças para a saúde humana, em razão da alta morbidade e dificuldade de controle, visto que existem vários produtos de origem animal que podem atuar como fonte de contaminação de *Salmonella spp.* e resultar em infecção. Atualmente, estamos em um mundo de produção alimentar globalizada, esse microrganismo pode atravessar fronteiras através da importação da carne de frango, e apresentar grandes riscos para a saúde pública (Kottwitz et al., 2010; Pires et al., 2014; Alikhan et al., 2022).

As Doenças Transmissíveis por Alimentos (DTA's), tem sido foco de discussão em todo mundo, sendo estimados que de 86% a 95% dos casos de salmonelose estejam envolvidos com o consumo de alimentos contaminados. No Brasil, Estados Unidos e Europa a *Salmonella spp.* é um dos principais agentes envolvidos em surtos da doença, causando aproximadamente 155.000 mortes por ano em todo mundo (Kottwitz et al., 2010; Perin et al., 2020).

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Salmonella* possui a forma de um bacilo Gram-negativo, são sensíveis ao calor e morrem a 70 °C mas podem sobreviver por até 2 anos em condições ambientais adversas e na poeira. A *Salmonella* é classificada em duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, essa última possui aproximadamente 60% de todos os sorovares do gênero abrangendo cerca de 2500 sorovares diferentes, todas elas patogênicas ao homem (Pandini et al., 2015a; Silva et al., 2015; Griffith; Carlson; Krull, 2019).

2.2. RESISTÊNCIA BACTERIANA

Para reduzir a carga de doenças infecciosas, os antimicrobianos tornaram-se essenciais na medicina. O mesmo ocorreu na produção de alimentos de origem animal, que afim de causar melhorias na eficiência alimentar passou a ter antimicrobianos adicionados às dietas (Bezerra et al., 2017; Mallmann et al., 2021; Mezarila et al., 2023).

Porém, o uso inadequado ou em excesso desses produtos tem sido um dos fatores que mais contribui para a seleção de patógenos resistentes, tornando algumas infecções bacterianas difíceis, ou até impossíveis de tratar de forma confiável (Hawkey, 2008; Van Baeckel et al., 2014). A exposição constante das bactérias e a pressão seletiva causada pelo uso excessivo de antimicrobianos levou ao aumento dos genes de resistência. A resistência bacteriana está atribuída a mutações cromossômicas, sendo que os microrganismos se adaptam e conseguem crescer mesmo na presença de antimicrobianos (Scur et al., 2014; Bezerra et al., 2017).

Mesmo o Brasil sendo o maior exportador de carne de frango no mundo, não foram encontrados relatórios sobre a quantidade de antimicrobianos vendidos e consumidos ao ano. Mas, um relatório publicado pela US Food and Drugs Administrations, mostrou que no ano de 2021 os animais destinados a alimentação humana consumiram cerca de 12 mil toneladas de antimicrobianos. (FDA, 2022; ABPA, 2023). Além disso, estima-se que em escala mundial 27.000 toneladas de antibióticos são utilizadas em saúde animal, e 25% foram destinados para a alimentação como promotores de crescimento (Mendes et al., 2013).

Diante da grande problemática com a resistência bacteriana, alguns países acabaram banindo o uso de antimicrobianos. Desde 2006, a União Européia proibiu o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento. Os mercados exportadores então tiveram de se adequar às novas legislações para que pudessem continuar a exportar (Bezerra et al., 2017).

Nesse contexto, como uma alternativa aos antimicrobianos destacam-se produtos oriundos das plantas, como extratos vegetais e óleos essenciais. Embora, os vegetais possuam atividade antimicrobiana comprovada, no Brasil trabalhos com produtos naturais no setor avícola ainda são poucos, tornando de grande importância mais pesquisas, buscando novos compostos para fins terapêuticos e/ou como promotores do crescimento, visto que os problemas com a resistência são bastante preocupantes (Weber et al., 2014; Pandini et al., 2015^a; Mezarila et al., 2023).

2.3. ANTIMICROBIANOS ALTERNATIVOS, AÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as melhores fontes para se obter moléculas ativas são as plantas, visto que a natureza é responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Extratos vegetais e óleos essenciais têm se mostrados promissores na tentativa de substituir os antimicrobianos sintéticos comumente utilizados, para os quais diversos microrganismos já se apresentam resistentes. (Bona et al., 2010; Carvalho et al. 2014; Costa et al., 2023).

Dentre os bioativos que podem ser extraídos das plantas, estão os óleos essenciais e extratos vegetais. A principal diferença entre esses compostos é que para obter os extratos vegetais utiliza-se qualquer parte da planta (folhas, caules, raízes, flores), sendo necessário considerar a natureza do que será extraído, bem como o solvente utilizado para a extração dos compostos químicos (Fascina et al., 2012; Pandini et al., 2015b). Já os óleos essenciais são líquidos oleosos, obtidos através da hidrodestilação, caracterizados como compostos voláteis com aroma específico, e assim como os extratos podem estar presentes em todas as regiões da planta, sendo encontrados principalmente na região foliar (Croteau, Kutchan, Lewis, 2000).

Nesses produtos existem diferentes princípios ativos com atividades biológicas, essas moléculas são oriundas do metabolismo secundário das plantas, os quais são utilizados como mecanismo de defesa contra a predação. Dentre as várias substâncias podem ser citadas os sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, compostos polifenólicos como flavonas, taninos e cumarinas; saponinas e flavonóides. Mas o maior destaque são os compostos fenólicos, que são os responsáveis principalmente, pelas propriedades antimicrobianas observadas nestes bioativos (Fascina et al., 2012; Furtado et al., 2015).

Dessa forma, estudos com produtos naturais tem por objetivo a diminuição do uso de antimicrobianos sintéticos, utilizando extratos vegetais e óleos essenciais na busca por bioativos semelhantes a esses antimicrobianos sintéticos comumente utilizados, porém com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência bacteriana e com menor impacto ambiental (Bona et al., 2014).

2.4. PESQUISAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS E SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Nos últimos anos muitos trabalhos referentes a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos vegetais vêm sendo realizados, isso devido a busca por uma alternativa aos antimicrobianos convencionais utilizados na avicultura. O Brasil é um dos países com maior abundância em relação a biodiversidade, possuindo uma ampla área para pesquisa de novos compostos bioativos (Santos et al., 2021).

Bona et al. (2010) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) que apresentou atividade inibitória para 8 sorovares de *Salmonella enterica*, sendo eles: Derby, Orion, Enteritidis, Enterica, Infantis, Mbandaka, Lexington e Kentucky.

Também Bona et al. (2012) avaliaram atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *Allium sativum* (alho) e *Dendanthema glandiflora* (crisântemo) que apresentaram grande potencial no controle dos 14 sorovares testados, inibindo irreversivelmente 78,6% (11/14) e 24,4% (3/14) dos microrganismos, com CBM de 50 µg/ml.

Pandini et al. (2015b) relataram que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Guarea Kuntiana* (fígado-do-mato) que foi considerada de moderada a elevada para os sorovares Infantis, Typhimurium e GIVE com Concentração Inibitória e Bactericida Mínima (CIM e CBM) de 54,6 µg/ml. Souza et al. (2017) observaram uma atividade elevada do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum caribaeum* (mamica—de-cadela) para Mbandaka, Shwarzengrund, Cubana, Senftenberg e Enteritidis com CIM e CBM variando entre 437µg/ml e 7000 µg/ml.

Outro estudo avaliou a atividade antimicrobiana de sete diferentes extratos das folhas de *Z. caribaeum* frente a onze sorovares de *S. enterica*, e todos apresentaram atividade antimicrobiana, destacando os extratos acetônico, de acetato de etila e metanólico, que inibiram o crescimento de todos os sorovares de *Salmonella* testados (Souza et al., 2017).

Mallmann et al. (2021) testaram extratos das folhas de *Ilex brevicuspis* (caúna) frente a dez diferentes sorovares de *Salmonella* spp., e observaram que o extrato hexânico apresentou atividade considerada moderada, e os sorovares *S. Santpaul*, *S. GIVE* e *S. Typhimurium* foram os mais suscetíveis com CIM e CBM de 12,5 mg/ml e 25 mg/ml, respectivamente.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente contexto, o exame crítico da literatura destaca a importância de pesquisas que se concentram em extratos vegetais e óleos essenciais como estratégias alternativas para mitigar a problemática da resistência apresentada por *Salmonella* spp. na indústria avícola. Estes compostos fitoterápicos emergem como promissores agentes antimicrobianos, oferecendo potencial eficácia no controle da disseminação de cepas resistentes, ao mesmo tempo em que minimizam os impactos adversos associados ao uso convencional de antimicrobianos.

A exploração dessas substâncias naturais não apenas sugere uma abordagem inovadora para a gestão da resistência bacteriana, mas também ressalta a necessidade premente de diversificação de estratégias de controle na indústria avícola. A consideração

e implementação de compostos derivados de fontes vegetais apresentam-se como um campo promissor para a pesquisa aplicada, buscando não apenas mitigar os riscos à saúde pública e animal, mas também promover a sustentabilidade ecológica dentro do setor.

Em síntese, a abordagem centrada em extratos vegetais e óleos essenciais surge como uma alternativa promissora, destacando-se como um campo de investigação relevante para aprimorar as práticas atuais na indústria avícola. O desenvolvimento contínuo nessa linha de pesquisa não apenas contribuirá para a eficácia no controle de *Salmonella* spp., mas também oferecerá perspectivas valiosas para a inovação sustentável e a gestão responsável na produção de aves.

REFERÊNCIAS

- [1] ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal Relatório anual de 2023**. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>> Acesso: 13 out. 2023.
- [2] ALIKHAN, N. F. et al. Dynamics of *Salmonella enterica* and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health. **PLoS Genetics**, v.18, n.6, p.e1010174, 2022. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1010174#sec001>> Acesso: 30 out. 2023.
- [3] BARROS, T. A. C.; GERALDO JÚNIOR, E. Dificuldades da avicultura na região do oeste do Paraná. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v.6, n.1, p.91-100, 2023.
- [4] BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso**, v.2, n.1, p.25-51, 2010.
- [5] BEZERRA, W. G. A. et al. Antibiotics in the poultry industry: a review on antimicrobial resistance. **Archivos de zootecnia**, v.66, n.254, p.301-307, 2017.
- [6] BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.
- [7] BONA, E. A. M. et al. 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, 2010.
- [8] CARVALHO, A. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, p.521-526, 2014.
- [9] CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Isolamento de Enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no Oeste do Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.4, n.3, p.243-247, 2002.
- [10] COSTA, R. J. O. et al. Perfil químico e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, v.16, n.2, p.859-873, 2023.
- [11] CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1268, 2000.
- [12] EL-SAADONY, M. T. et al. The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview. **Poultry Science**, v.101, n.4, p.101716, 2022.
- [13] FASCINA, V. B. et al. Phytogetic additives and organic acids in broiler chicken diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.2189-2197, 2012.
- [14] FDA. **Food and Drugs Administration**. Relatório anual sobre antimicrobianos vendidos ou distribuídos em 2021 para uso em animais produtos de alimentos. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/animal-veterinary/cvm-updates/fda-releases-annual-summary-report-antimicrobials-sold-or-distributed-2021-use-food-producing>> Acesso: 31 out 2023.

- [15] FURTADO, J. M., et al. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* frente a bactérias de interesse. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.17, n.4, p.233-7, 2015.
- [16] GRIFFITH, R. W.; CARLSON, S. A.; KRULL, A. C. Salmonellosis. **Diseases of swine**, p.912-925, 2019.
- [17] HAWKEY, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.1-9, 2008.
- [18] IBRAHIM, M. A. et al. Seroepidemiological studies on poultry salmonellosis and its public health importance. **Journal of World's Poultry Research**, v.3, n.1, p.18-23, 2013.
- [19] KOTTWITZ, L. B. M. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no períodos de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.32, n.1, p.9-15, 2010.
- [20] LEONÍDEO, A. R. A. et al. Genes de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.8, n.15, p.574-614, 2015.
- [21] MALLMAN, A. P. et al. Rendimento, caracterização fitoquímica e avaliação de atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de *Ilex brevicaulis* Reissek (Aquifoliaceae) frente a sorotipos de *Salmonella* spp de origem avícola. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n.3, p. 29143-29158, 2021.
- [22] MENDES, F. R. et al. Utilização de antimicrobianos na avicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.10, n.2, p.2352-2389, 2013.
- [23] MEZALIRA, T. S. et al. A problemática da resistência aos antimicrobianos na avicultura e a busca por produtos alternativos como o extrato de *Pereskia aculeata* Mill. **Seven Editora**, 2023.
- [24] OUROFINO. **Ourofino Saúde Animal**. 03 de janeiro de 2017. Disponível em: <<https://www.ourofino.saudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/salmonelose-na-avicultura/>> Acesso: 14 nov. 2023.
- [25] PANDINI, J. A. et al. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.9, p.3, 2015b.
- [26] PANDINI, J. A. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Instituto Arquivo Biológico**, São Paulo, v.82, p.1-6, 2015a.
- [27] PASCHOAL, A. C. C.; LUCIANO, F. B.; MACEDO, R. E. F. de. Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos naturais contra *Salmonella* Enteritidis. In: Seminário de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 21., 2013, Curitiba. **Anais eletrônicos**. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2013. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reo/l/semic2013/trabalho.php?dd0=10988&dd90=e26cfd01ae&dd10=view.html>>. Acesso em: 01 ago. 2017.
- [28] PERIN, A. P. et al. Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.51, p.335-345, 2020.
- [29] PIRES, S. M. et al. Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. **Foodborne pathogens and disease**, v.11, n.9, p.667-676, 2014.
- [30] RIZZO, P. V. et al. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.4, p.801-807, 2010.
- [31] SANTOS, C. V. et al. Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). **Research, Society and Development**, v.10, n.3, p.e20510313303, 2021.
- [32] SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v.76, n.1, p.101-108, 2016.
- [33] SCUR, M. C. et al. 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.

- [34] SILVA, C. B. C. et al. Seroprevalence of *Salmonella* and *Mycoplasma* in commercial broilers, backyard chickens, and spent hens in the region of Triângulo Mineiro, state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.17, n.1, p.57-62, 2015.
- [35] SOUZA, J. G. L. et al. Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos vegetais das folhas de "*Zanthoxylum caribaeum*" Lam. frente a sorotipos de "*Salmonella*". **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.18, n.3, p.446-453, 2017.
- [36] TEIXEIRA, E. S. M.; TEIXEIRA, M. J. Importância da carne de frango brasileira no mercado mundial. In: **CONGRESSO FATECLOG, GESTÃO DA CADEIA DE SUPRIMENTOS NO AGRONEGÓCIO: DESAFIOS E OPORTUNIDADES NO CONTEXTO ATUAL**. 2021.
- [37] VAN BAECKEL, T. P. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)> Acesso em: 22 out. 2023.
- [38] VAZ, A. N. et al. Pesquisa de *Salmonella* em Mutuns (*Mitu mitu*) mantidos em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.1, p.68-72, 2015.
- [39] WEBER, L. D. et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidante activity of essential oil and various plant extrats from *Prumus myrtifolia*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 9, p. 846-853, 2014.

Capítulo 4

Potencial antioxidante dos óleos essenciais de Myrcia: uma perspectiva para produtos naturais e sustentáveis

Amanda Janaina Gonsatti Feitosa¹

Camila Vogt dos Santos²

Debora Marina Bandeira³

Andressa Guarnieri Canton⁴

Jéssica Rosset⁵

Fabiana Gisele da Silva Pinto⁶

Resumo: As plantas sintetizam, por meio de seu metabolismo secundário, compostos bioativos que incluem a produção de antioxidantes. Estes últimos, desempenham um papel crucial na promoção da saúde humana e animal, atuando no equilíbrio fisiológico, modulação das vias biológicas e na regulação da produção e manutenção de antioxidantes. Como proteínas, esses antioxidantes desempenham uma função protetora nos tecidos contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Neste contexto, os óleos essenciais emergem como potenciais alternativas para a substituição de produtos sintéticos por soluções naturais, especialmente na indústria alimentícia e de medicamentos, devido às suas propriedades antioxidantes. O presente estudo traz uma abordagem metodológica que consistiu na pesquisa de artigos relacionados à atividade antioxidante de óleos essenciais do gênero *Myrcia*, publicados entre os anos de 2018 e 2023, nas plataformas científicas SciELO e Google Scholar. O objetivo principal da pesquisa foi destacar as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais provenientes de plantas do gênero *Myrcia*, considerando a crescente busca por alternativas naturais à substituição de produtos sintéticos.

Palavras-chave: Antioxidante. Óleo Essencial. *Myrcia*.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-4902-0972>

² Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-7566-8003>

³ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-5956-7210>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-4627-4985>

⁵ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-8348-0649>

⁶ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>

1. INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos originam-se do metabolismo secundário das plantas e estão distribuídos por todo o organismo vegetal. Uma das notáveis características desses compostos reside em sua capacidade antioxidante, sendo os flavonoides, carotenoides e compostos fenólicos os mais proeminentes nesse contexto (Silva et al., 2010).

Os compostos antioxidantes conferem benefícios à saúde humana ao contribuir para o equilíbrio fisiológico e a modulação das vias biológicas (Smeriglio et al., 2019). Os antioxidantes endógenos desempenham papéis cruciais na produção, equilíbrio e manutenção dessas substâncias, uma vez que são proteínas responsáveis por proteger os tecidos contra os danos causados pelo estresse oxidativo (Singh et al., 2019; Jawed et al., 2019). A oxidação lipídica representa um dos desafios preeminentes enfrentados pela indústria devido à sua capacidade de induzir sabores e odores indesejados nos produtos (Santos et al., 2020). Portanto, a busca por alternativas torna-se de extrema importância, visando substituir o uso de antioxidantes sintéticos na indústria, e explorando produtos naturais como fontes de antioxidantes para promover a saúde tanto humana quanto animal.

Os óleos essenciais consistem predominantemente em sesquiterpenos, monoterpenos e fenilpropanoides, sendo esses compostos responsáveis pela origem e conferência das características organolépticas dos óleos. Tais substâncias estão amplamente distribuídas nos órgãos vegetativos das plantas. Os óleos essenciais encontram diversas aplicações, incluindo a indústria cosmética, perfumaria (para aromas e fragrâncias), setor alimentício e até mesmo na formulação de medicamentos. (Craveiro et al., 1993; Silva-Santos et al., 2006; Bizzo et al., 2009).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos ultimamente, com foco nas atividades biológicas dos óleos essenciais, alguns exemplos de propriedades que os óleos essenciais apresentam são: antioxidantes, antimicrobianas, entre outras (Miranda, 2010).

Sendo assim, o presente capítulo tem como objetivo apresentar as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais de plantas do gênero *Myrcia*, uma vez que, alternativas para substituições de produtos sintéticos por produtos de origem natural, na indústria alimentícia e de medicamentos, vem se tornando cada vez mais frequente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. COMPOSTOS BIOATIVOS E OS ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas, em sua totalidade, contêm uma variedade de compostos bioativos. Esses compostos são derivados do metabolismo secundário das plantas e, quando liberados no solo, têm o potencial de causar interferências positivas ou negativas em outros organismos ou microrganismos próximos (fenômeno conhecido como alelopatia). Além disso, esses compostos podem exibir atividade antimicrobiana e/ou antioxidante (Brass, 2009; Silva et al., 2010).

Devido às diversas atividades que apresentam, os óleos essenciais têm sido objeto de estudos significativos na atualidade. Os óleos essenciais são compostos orgânicos aromáticos e voláteis encontrados nos órgãos vegetativos das plantas, sendo passíveis de extração por meio de técnicas como a hidrodestilação. Suas aplicações abrangem diversas áreas, incluindo alimentos, cosméticos, perfumaria, entre outros (Craveiro et al., 1993; Silva-Santos et al., 2006; Bizzo et al., 2009).

Devido à elevada concentração de compostos bioativos em sua composição, os óleos essenciais manifestam uma ação farmacológica significativa. Isso ocorre em virtude da presença de diversas classes de metabólitos secundários, os quais conferem atividades biológicas essenciais para a promoção da saúde, tanto em seres humanos quanto em animais (Ehlert et al., 2006). Sendo assim, a identificação dos compostos bioativos presentes nas espécies vegetais é de extrema importância, pois, quando conhecemos quais compostos estão presentes, podemos deduzir suas possíveis atividades biológicas e direcionar as pesquisas para desenvolvimento de novos produtos de origem natural.

2.2. ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são de extrema importância para as células, pois, auxiliam no controle e na diminuição de danos oxidativos celulares, resultantes da presença de radicais livres. Existem variadas classes dentre os antioxidantes, os compostos fenólicos, por exemplo, têm como abrangência, classes como antocianinas, flavonas, flavonoides dentre outros como o ácido ascórbico (vitamina C), também pertencente a classe dos antioxidantes (Feitosa, 2017).

Os flavonoides, desempenham várias funções na planta, algumas delas são: proteção contra insetos, vírus, fungos, bactérias, radiação ultravioleta entre outras (Santos & Rodrigues, 2017), além de serem caracterizados, como inibidores de células cancerosas, por conta de apresentarem propriedades antioxidantes, que possivelmente, são responsáveis por controlar a proliferação dessas células e bloqueio da oncogênese (Hung et al., 2009; Amado et al., 2011).

O estresse oxidativo é resultado da produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), além de fatores exógenos, que podem resultar em problemas na homeostase do organismo, por conta do desequilíbrio gerado no sistema oxidante e antioxidante, desencadeando alterações funcionais e estruturais de proteínas, peroxidação lipídica e danos no DNA (Vasconcelos et al., 2007). Enzimas catalase, glutatona e superóxido dismutase, são antioxidantes endógenos e estão envolvidos no equilíbrio e manutenção dos agentes oxidantes, tendo atuação na proteção dos tecidos contra danos provenientes das ERNs e EROs, todavia, se houver debilitação no sistema antioxidante e excesso de produção dos radicais oxidantes, se tem o desencadeamento do estresse oxidativo, que se expressa através da aceleração no processo de envelhecimento e aparecimento de doenças (Rahal et al., 2014; Jawed et al., 2019; Singh et al., 2019).

Sendo assim, os estudos voltados para antioxidantes de origem vegetal, como os óleos essenciais e extratos vegetais, vem sendo cada vez mais frequentes, por conta da atividade antioxidante apresentada por essas substâncias, que proveem bioativos benéficos a saúde, controlando os radicais livres nas células e até mesmo evitando deterioração de alimentos (Pupo & Gallo, 2007; Tomei & Salvador, 2007; Moon & Shinamoto, 2009).

2.3. GÊNERO MYRCIA E OS ANTIOXIDANTES DE SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS

A família Myrtaceae tem abrangência de cerca de 132 gêneros e 5.950 espécies, sendo localizadas em regiões tropicais e subtropicais do planeta (Farag et al., 2018). Os óleos essenciais dos representantes desta família, contém propriedades aromáticas e medicinais (Bida et al., 2019), tendo suas atividades biológicas descritas com frequência,

como exemplo: ação antibacteriana e anticâncer (Dias et al., 2019), antioxidante (Maggio et al., 2019), antiparasitária (Gevú et al., 2019), entre outras.

O gênero *Myrcia*, tem destaque pelo seu potencial terapêutico, sendo que muitas espécies, já apresentaram atividade antioxidante, antiinflamatória, analgésica e citotóxica, e a relação deste gênero com seu uso na medicina popular para diabetes, tem muitos relatos (Russo et al., 1990; Stefanello et al., 2011). Dentro do gênero *Myrcia*, várias espécies já foram estudadas quanto aos seus potenciais biológicos. As espécies de *Myrcia multiflora*, *M. shaerocarpa* e *M. salcifolia* são utilizadas no tratamento da diabetes (Russo et al., 1990), *M. amazonica* tem suas folhas utilizadas para tratamento de leucemia (Mors et al., 2000) e *Myrcia hatschbachii* D. Legrand tem seu óleo essencial, que pode ser usado como bioherbicida e apresenta atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (Gatto et al., 2020).

Quanto ao óleo essencial proveniente das folhas de espécies do gênero *Myrcia* e suas possíveis atividades antioxidantes, Silva e colaboradores (2018), coletaram as folhas de *M. sylvatica* (G. Mey.) DC. no mês de agosto e observaram baixa atividade antioxidante da espécie. Já Santos e colaboradores (2021), demonstraram elevada atividade antioxidante, de até 82,81% com o óleo essencial de *Myrcia palustris* DC., Gatto e colaboradores (2020), também observaram resultados significativos, para a atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand e tiveram suas folhas coletadas no mês de abril.

Os três trabalhos de atividade antioxidante apresentados anteriormente, tiveram resultados variados quanto a atividade antioxidante de seus respectivos óleos, de baixa até elevada atividade. Geralmente, possíveis motivos para tais variações, nos resultados apresentados pelos autores, podem ser relacionadas com a época de coleta das folhas, condições climáticas, variabilidade genética, além de que, as substâncias e suas quantidades presentes em cada espécie, também têm grande influência (Sá et al., 2012; Rosa et al., 2016). Estudos que avaliaram a atividade antioxidante de espécies do gênero *Myrcia*, já apresentaram atividade antioxidante moderada do gênero, como exemplo, *Myrcia oblongata* (Santana et al., 2018), *Myrcia splendens*, *Myrcia bella*, *Myrcia tomentosa*, entre outras (Magina et al., 2010).

3. METODOLOGIA

Para a elaboração do presente capítulo, que versa sobre as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais de plantas pertencentes ao gênero *Myrcia*, realizou-se uma revisão bibliográfica nas plataformas científicas SciELO e Google Scholar. A busca abrangeu o período de 2018 a 2023 e foi utilizado como termos-chave as palavras "antioxidante", "*Myrcia*" e "óleo essencial". A seleção criteriosa resultou na identificação de 4 artigos pertinentes ao tema, sendo quatro deles dedicados ao estudo do óleo essencial extraído das folhas. Desse conjunto, dois artigos estavam redigidos em língua inglesa, enquanto os outros dois estavam em língua portuguesa.

Cabe ressaltar que foram excluídos da análise os artigos que não abordavam somente o gênero *Myrcia*, aqueles que investigavam a atividade antioxidante de extratos vegetais em detrimento dos óleos essenciais, bem como os que versavam sobre óleos essenciais obtidos de partes da planta distintas das folhas. Esta abordagem seletiva visou garantir a pertinência e especificidade dos estudos considerados, consolidando assim

uma base sólida para a análise das propriedades antioxidantes dos óleos essenciais de *Myrcia*, especialmente quando provenientes de suas folhas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, portanto, que tanto o gênero *Myrcia* quanto a família Myrtaceae apresentam uma diversidade de atividades biológicas, que incluem propriedades antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas, entre outras. A análise dos óleos essenciais das espécies mencionadas ao longo do capítulo revela uma gama variada de atividades antioxidantes, desde níveis mais baixos até atividades consideráveis. Essas variações podem ser atribuídas a diversos fatores, como as condições climáticas, a época da coleta das folhas, entre outros. Portanto, é evidente que o gênero *Myrcia* apresenta atividade antioxidante em seus óleos essenciais, sendo essa atividade sujeita a variações dependentes da espécie em questão.

REFERÊNCIAS

- [1] AMADO, N. G. *et al.* Flavonoids: potential wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life Sciences**. v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.
- [2] BIDA, M. R.; DOMINGUEZ, J.; JONES MIGUEL, D.; GUERRERO, A.; PAGANO, T. Essential oil compounds from the leaf of *Eugenia samanensis* Alain (Myrtaceae), a species endemic to the Samaná Peninsula, Dominican Republic. **Journal of Essential Oil Research**. v.31, n.2, p.154-159, 2019. DOI: 10.1080/10412905.2018.1518275.
- [3] BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. v.32, n.3, p.588-594, 2009.
- [4] BRASS, F. E. B. Análise de atividade alelopática de extrato aquoso de falsa-murta sobre a germinação de picão-preto e caruru. **Centro Científico Conhecer – Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 5, n. 8, 2009.
- [5] CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C.; **Química Nova**. v.16, p.224, 1993.
- [6] DIAS, A. L. B.; BATISTA, H. R. F.; ESTEVAM, E. B. B.; ALVES, C. C. F.; FORIM, M. R.; NICOLELLA, H. D.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; SILVA, T. S.; MARTINS, C. H. G.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtilloides* O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research**. v.33, n.17, p.2566-2570, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2018.1457664.
- [7] EHLERT, P.A.D.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; CAMPOS, D.A.; ALVIANO, C.S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira**. v.8, n.2, p.79- 80, setembro, 2006.
- [8] FARAG, N. F., *et al.* Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics. **Industrial Crops and Products**. v.124, p.870-877, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.07.066.
- [9] FEITOSA, C. M. **Antioxidantes aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos**. Editora Átomo. Campinas-SP, p.11-137, 2017.
- [10] GATTO, L. J. *et al.* Chemical composition, phytotoxic potential, biological activities and antioxidant Properties of *Myrcia hatschbachii* D. Legrand essential oil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.56, e18402, 2020.
- [11] GEVÚ, K. V. *et al.* Chemical Composition and Anti-Candida and Anti-Trypanosoma cruzi Activities of Essential Oils from the Rhizomes and Leaves of Brazilian Species of *Renealmia* L. fil. **Records of Natural products**. v.13, n.3, p.268-280, 2019. DOI: 10.25135/rnp.105.18.08.125.

- [12] HUNG, J. Y. et al. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**. v. 68, n. 3, p. 366-374, 2009.
- [13] JAWED, H.; SHAMIM, M.; SOHAIL, S.; FIRDOUS, U.; IQBAL KHAN, N. Antioxidative activity of clove (*syzygium aromaticum*) oil administration in Middle cerebral artery occlusion (mcao) Models of acute focal cerebral ischemia. **Pakistan Journal of Neurological Sciences (PJNS)**. v.14, n.1, p.10-15, 2019.
- [14] MAGGIO, A. et al. Comparative chemical composition and bioactivity of leaves essential oils from nine Sicilian accessions of *Myrtus communis* L. **Journal of Essential Oil Research**. p.1-10, 2019. DOI: 10.1080/10412905.2019.1610089.
- [15] MAGINA, M. A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H. H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v.29, n.2, p.376-382, 2010.
- [16] MIRANDA, C. A. S. F. Atividade antioxidante de óleos essenciais de diversas plantas. 2010. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de lavras. 2010.
- [17] MOON, J. K.; SHINAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p.1655-1666, 2009.
- [18] MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. Medicinal Plants of Brasil. **Reference Publications**, Inc. Algonac, Michigan, p.501, 2000.
- [19] PUPO, M. T.; GALLO, M. C. B. Biologia química: uma estratégia para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**. v. 30, p. 1446-1455, 2007.
- [20] RAHAL et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**. 2014. DOI:10.1155/2014/761264.
- [21] ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.18, n.1, p.19-26, 2016.
- [22] RUSSO, E. M. K.; REICHEL, A. A. J.; SÁ, J. R.; FURLANETTO, R. P.; MOISES, R. C. S.; KASAMATSU, T. S.; CHACRA, A. R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.23, n.1, p.11-20, 1990.
- [23] SÁ, F. A. S.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M.; SAMPAIO, B. L.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição e variabilidade do óleo essencial da parte aérea de *Myrcia tomentosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.22, n.6, p.1233-1240, 2012.
- [24] SANTANA, C. B.; SOUZA, J. G. de L.; CORACINI, M. D. A.; WALERIUS, A. H.; SOARES, V. D.; COSTA, W. F.; PINTO, F. G. S. Chemical composition of essential oil from *Myrcia oblongata* DC and potencial antimicrobial, antioxidant and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778). **Bioscience Journal**. v.34, n.4, p.996-1009, 2018. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-39599>.
- [25] SANTOS, C. V.; MALLMAN, A. P.; TOLEDO, A. G.; BANDEIRA, D. M.; DA COSTA, W. F.; MARINS, D. M. A.; CORRÊA, J. M.; PINTO, F. G. S. Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas *Myrcia palustris* DC. (MYRTACEAE). **Research, Society and Development**. v.10, n.3, e20510313303, 2021.
- [26] SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonóides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**. Macapá, v.7, n.3, p.29-35, 2017.
- [27] SANTOS, J. R. N.; TELES, A. M.; FERREIRA, C. G.; MOUCHREK, A. N. Avaliação da atividade bactericida e antioxidante do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgare*). **Research Society and Development**. v.9, n.10, e7829108410, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8410>.
- [28] SILVA, L. A.; RAPOSO, J. D. A.; CAMPOS, L. P. G.; CONCEIÇÃO, E. C.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**. v.12, n.2, p. 117-126, 2018.

- [29] SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; DOS SANTOS SANTANA, A.; KOBLOITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**. v.31, n.3, p.669-681, 2010.
- [30] SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A.; **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.8, p.14, 2006.
- [31] SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**. v.24, n.8, p.1583, 2019.
- [32] SMERIGLIO, A. et al. Feijoa Fruit Peel: Micro-morphological Features, Evaluation of Phytochemical Profile, and Biological Properties of Its Essential Oil. **Antioxidants**. v.8, n.8, p.320, 2019. DOI: 10.3390/antiox8080320.
- [33] STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**. v.8, n.1, p.73-94, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000098>.
- [34] TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 11., e Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 7., 2007, Campinas. Anais. Universidade do Vale do Paraíba, v. 1, p. 1963-1967, 2007.
- [35] VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

Capítulo 5

Perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de Salmonella enterica provenientes de carcaças de frango do oeste do Paraná

*Lais Gabriela Rizzoto*¹

*Camila Vogt dos Santos*²

*Mayara Maria de Souza*³

*Debora Marina Bandeira*⁴

*Jaíne Freita de Souza*⁵

*Andressa Guarnieri Canton*⁶

*Fabiana Gisele da Silva Pinto*⁷

Resumo: O presente estudo foi realizado para verificar o perfil de resistência a agentes antimicrobianos de diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* isoladas em carcaças de frango de corte na região oeste do Paraná frente. Foram testados 10 diferentes sorotipos *Salmonella enterica* de maior incidência, sendo: *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Gallinarum*, *S. Heidelberg* e *S. Orion*. A determinação do perfil de resistência para os 10 sorotipos de *Salmonella enterica* identificados foi realizada frente a 12 antimicrobianos comerciais, sendo: ácido nalidíxico (30 µg), amoxicilina (30 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), estreptomicina (10 µg), imipenem (10 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacina (10 µg), sulfazotrin (25 µg), tetraciclina (30 µg) e trimetropina (10 µg) pela metodologia de disco-difusão. Os sorotipos que apresentaram os maiores índices de resistência foram: *S. Heidelberg*, *S. Newport* e *S. Typhimurium*. Os resultados indicam que 30% dos sorotipos de *S. enterica* apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos, com diferentes padrões de resistência. O maior percentual de resistência foi verificado no sorotipo *S. Newport* a três antimicrobianos (trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol e tetraciclina). Os níveis de resistência indicam que os antimicrobianos devem ser utilizados nos aviários de forma prudente, buscando assim, minimizar a disseminação de cepas resistentes e possíveis patógenos.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Resistência. Sorotipos.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0002-5780-8935>

² Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-7566-8003>

³ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0000-0444-1442>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-5956-7210>

⁵ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0004-6309-411X>

⁶ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-4627-4985>

⁷ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>

1. INTRODUÇÃO

A produção de frango de corte é de extrema importância para o estado do Paraná e para a economia brasileira, uma vez que o país é o segundo maior produtor e exportador de frango do mundo. Em 2022, o volume de produtos exportados, incluindo in natura e processados, totalizou 4,610 milhões de toneladas (ABPA, 2022). A avicultura industrial do Brasil está em constante evolução e o sistema de contratos de integração entre produtores e indústria tem sido o método predominante para alcançar os mercados mais desejados do mundo, aumentando a produtividade, reduzindo custos e mantendo um alto padrão de qualidade nos produtos. De acordo com dados do Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná (SINDIVIAPAR), o Paraná se mantém como maior produtor de frangos do Brasil e responde por 35,54 % de toda carne de frango produzida e exportada pelo país.

Entre os patógenos transmitidos pela avicultura, destaca-se o gênero *Salmonella* que é amplamente encontrado na natureza e capaz de infectar tanto seres humanos quanto animais (Silva, Duarte, 2002). Além de causar perdas na produtividade do setor avícola devido ao aumento da mortalidade e contaminação de produtos para o consumo humano (Santos, Moreira, Dias, 2009), as salmonelas representam um grande desafio para a saúde pública, já que a sua eliminação de granjas avícolas é complexa e muitas vezes impraticável devido a diversas fontes de infecção e sua capacidade de disseminação entre hospedeiros e vetores (Andino, Hanning, 2015; Antunes et al., 2016).

Essas bactérias do gênero *Salmonella* spp. pertencem a família *Enterobacteriaceae* e são divididas em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Muitos sorotipos estão identificados atualmente, dentre estes a *S. enterica* subsp. *enterica*, inclui os de maior importância para a avicultura e para a saúde pública. Dentro da espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* os sorotipos que recebem maior atenção são: Pullorum, Gallinarum, e Enteritidis, por causarem prejuízos econômicos na avicultura mundial e doenças em humanos (Santos, Moreira, Dias, 2009).

Para o controle da salmonelose é necessário o uso de antimicrobianos para o tratamento, sendo também utilizado na produção animal, como promotores de crescimento (Kottwitz et al., 2008). Isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes com alta adaptabilidade, têm sido responsáveis por muitos surtos de doenças transmitidas por alimentos (Xu et al., 2020). Contudo o uso extensivo desses produtos em animais destinados à alimentação humana é uma das prováveis causas da emergência de cepas de salmonela resistentes (Silva, Duarte, 2002), ocasionando obstáculos aos procedimentos clínicos, além de aumentar os custos do tratamento e das doenças na população humana (Lima, Andreatti-Filho, Pinto, 2009).

Com o intuito de minimizar a ocorrência de enfermidades bacterianas, os antimicrobianos possuem reconhecido destaque na rotina médica, tanto veterinária, quanto humana. Dentre as classes mais utilizadas, incluem β -lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, anfencóis, quinolonas, fluoroquinolonas e sulfonamidas (Moreno-Bondi et al., 2009). No entanto é importante ter cuidado no controle e prevenção de salmoneloses nas aves é fazendo o controle epidemiológico, pois há tratamento somente na medicina humana. Na avicultura as prescrições de antimicrobianos são utilizadas em outros tipos de infecções tal como em quadros de enfermidades respiratórias.

No Brasil através da instrução normativa nº 9, de 27 de junho de 2003 (Brasil, 2003) que limitou e proibiu a utilização de vários fármacos. Desta maneira proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. A portaria nº 31, de 29 de janeiro de 2002 (Brasil, 2002) determina o cancelamento dos registros, na área de alimentos para animais, de todos os produtos formulados com princípios ativos à base de arsênicas e antimoniais a instrução normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016, estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* nos estabelecimentos avícolas comerciais e de abate, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Devido ao surgimento de cepas resistentes em frangos causadas proveniente de vários sorotipos de *Salmonella* spp., o presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil de resistência a antimicrobianos destas bactérias isoladas em carcaças de frango de aviários do Oeste do Paraná,

2. METODOLOGIA

2.1. AMOSTRAS

Foram isoladas 83 cepas de *Salmonella* provenientes de granjas do oeste do PR e tipificadas no Instituto Adolfo Lutz. Destas cepas isoladas, foram escolhidas aleatoriamente 10 sorotipos para os testes de perfil de resistência a antimicrobianos, sendo 1 representante de cada sorotipo identificado. As cepas de *Samonella enterica* foram obtidas da Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais e de Interesse Ambiental e Biotecnológico da UNIOESTE – CCMMIAB vinculada ao Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.

Foram utilizados 10 sorotipos de *Salmonella enterica* sendo: *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Gallinarum*, *S. Heidelberg* e *S. Orion*.

2.2. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS *SALMONELLA ENTERICA*

Uma alçada de cada sorotipo de *Salmonella* foi repicado em ágar nutriente (AN), ágar *Salmonella Shigella* e Ágar Xilose-Lisina Deoxicolato (XLD), e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias características transferidas para tubos contendo AN e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram submetidas aos testes de reação em ágar tríplice açúcar ferro (TSI), citrato, Agar motilidade, indol, ornitina (MIO) e Caldo Lisina descarboxilase.

2.3. TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Os sorotipos foram recuperados em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) a 37°C por 18h antes do teste, semeados em placa de Petri com meio cultura Agar Mueller Hinton. O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado pela metodologia de difusão em disco de Kirby-Bauer e de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2017). Foram testados 12 agentes antimicrobianos (LABORCLIN®): ácido nalidíxico (30 µg), amoxicilina (30 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), estreptomicina (10 µg), imipenem (10 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacina (10 µg), sulfazotrin (25 µg), tetraciclina (30 µg) e trimetropina (10 µg).

Para a realização do antibiograma, colônias recém-cultivadas (18-24hs) das bactérias isoladas e já identificadas foram inoculadas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e o valor da densidade óptica foi ajustado para 0,5 na escala de McFarland (grau de turbidimetria que equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, o inóculo de cada bactéria foi semeado com auxílio de um suabe estéril em placas contendo Agar Mueller Hinton. Após breve período para a secagem do inóculo sobre a superfície do Agar, foram distribuídos os discos de antibióticos (Multidisco, Laborclin, Brasil). Os antibióticos foram escolhidos de acordo com a preconização do CLSI (2017).

Os sorotipos que apresentaram resistência intermediária foram agrupados com as amostras sensíveis para evitar superestimação da resistência. Foram utilizadas como cepas de referência *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (American Type Culture Collection) e *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram consideradas multirresistentes as linhagens que apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do teste de suscetibilidade dos sorotipos de *Salmonella* aos agentes antimicrobianos demonstraram que a maioria dos sorotipos testados, 8 (70%) apresentaram suscetibilidade a todos os antimicrobianos em diferentes níveis. Os sorotipos *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* foram os únicos a apresentar resistência aos antimicrobianos. O *S. Newport* apresentou resistência a três antimicrobianos testados, sendo *Trimetropim*, *Sulfazotrim* e *Tetraciclina*. O sorotipo *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium* apresentaram resistência a ao ácido *Nalidíxico*. Os sorotipos que apresentaram resistência equivalem a 30% das cepas analisadas. Os demais antimicrobianos foram eficientes para todos os sorotipos testados (Tabela 1 e Figura 1). Em geral, foram observados nas amostras dois padrões de resistência única e um de resistência tripla, variando de um a três antimicrobianos.

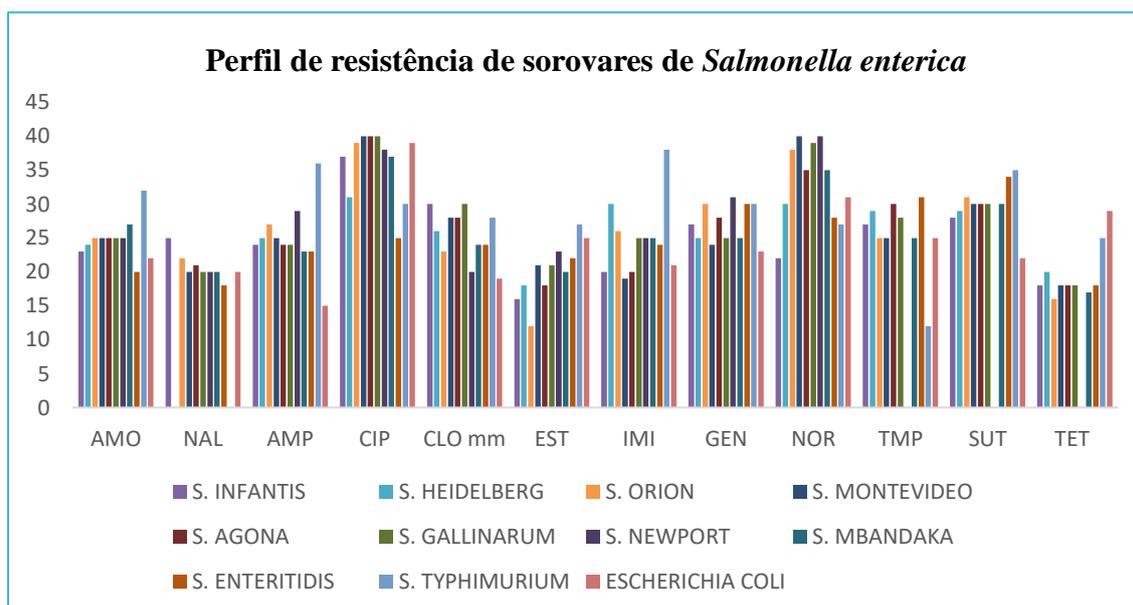
Tabela 1: Perfil de resistência de sorotipos de *Salmonella enterica* a antimicrobianos

SOROVARES	AMO mm	NAL Mm	AMP mm	CIP mm	CLO mm	EST Mm	IMI Mm	GEN mm	NOR mm	TMP mm	SUT Mm	TET mm
S. Infantis	23	25	24	37	30	16	20	27	22	27	28	18
S. Heidelberg	24	R	25	31	26	18	30	25	30	29	29	20
S. Orion	25	22	27	39	23	12	26	30	38	25	31	16
S. Montevideo	25	20	25	40	28	21	19	24	40	25	30	18
S. Agona	25	21	24	40	28	18	20	28	35	30	30	18
S. Gallinarum	25	20	24	40	30	21	25	25	39	28	30	18
S. Newport	25	20	29	38	20	23	25	31	40	R	R	R
S. Mbandaka	27	20	23	37	24	20	25	25	35	25	30	17
S. Enteritidis	20	18	23	25	24	22	24	30	28	31	34	18
S. Typhimurium	32	R	36	30	28	27	38	30	27	12	35	25
E. coli	22	20	15	39	19	25	21	23	31	25	22	29

AMO: amoxicilina; NAL: Ácido nalidíxico; AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Cloranfenicol; EST: Estreptomicina; IPM: Imipenem; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacin; TMP: Trimetoprina; SUT: Trimetoprim-sulfametoxazol; TET: Tetraciclina; R= resistente.

No geral, onze antimicrobianos mostraram-se eficientes frente aos sorotipos de *Salmonella*, sendo eles: Amoxicilina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Imipenem, Gentamicina, Norfloxacin, sem resistência e Trimetoprim, Trimetoprim-sulfametoxazol, e Tetraciclina com uma resistência cada. Esses dados corroboram a pesquisa realizada por Duarte et al., (2009), que avaliaram a suscetibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango de corte e verificaram que 31,6% das amostras foram resistentes à tetraciclina, e 21% ao ácido nalidíxico.

Em estudo realizado por Pandini et al., (2015), foi observado que os sorotipos de *Salmonella* Heidelberg apresentaram 100% de resistência ao antimicrobiano ácido nalidíxico. Fato que corrobora os resultados do presente estudo, pois o sorotipo *Salmonella* Heidelberg também apresentou resistência ao ácido nalidíxico.

Figura 1: Perfil de resistência de sorotipos de *Salmonella enterica* frente a antimicrobianos

AMO: amoxicilina; NAL: Ácido nalidíxico; AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Cloranfenicol; EST: Estreptomicina; IPM: Imipenem; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacina; TMP: Trimetoprina; SUT: Trimetoprim-sulfametoxazol; TET: Tetraciclina.

Outro trabalho que corrobora ao presente estudo demonstra que a resistência, especialmente de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg, a um ou mais antimicrobianos foi aumentada consideravelmente na década passada, na Europa (Saeed e Nair, 1999). O que no presente estudo foi semelhante pois os sorotipos da *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg foram resistentes ao mesmo antimicrobiano, o ácido nalidíxico.

A literatura revela uma crescente presença de bactérias com múltipla resistência a agentes antimicrobianos. No estudo de Silva et al., (2014), das vinte amostras de *Salmonella* spp analisadas, dez (50%) apresentaram multirresistência. No presente estudo, apenas 30% dos sorotipos testados apresentaram uma resistência, sendo apenas a *Salmonella* Newport apresentando multirresistência.

No estudo feito por Figueiredo et al., (2013), que analisaram a resistência antimicrobiana em isolados de *S. enterica* provenientes de alimentos de origem animal de 94 amostras, 39 amostras (42%) foram positivas para *Salmonella* e os maiores índices de resistência antimicrobiana foram observados para a tetraciclina (31%) e ampicilina (21%). Já no presente estudo houve apenas resistência do sorotipo de *Salmonella* Newport para a tetraciclina, já com a ampicilina, todos os sorotipos foram sensíveis.

De todos os sorotipos testados, 70% foram 100% suscetíveis aos antimicrobianos testados. Dados semelhantes foram observados em Cardoso et al., (2006) encontraram resultados de 100% de suscetibilidade de *Salmonella* Enteritidis à ciprofloxacina e norfloxacina, e 3,75% de resistência para enrofloxacina.

O aumento da resistência antimicrobiana pode ser veiculado ao uso intensivo de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal e posterior disseminação dos genes que carregam esta resistência a outros micro-organismos (Wegener et al., 1999). A importância do uso de antimicrobianos de forma mais segura e prudente ou até mesmo da substituição dos antimicrobianos sintéticos existentes por antimicrobianos alternativos naturais, assim como o monitoramento constante de *Salmonella* na cadeia avícola, contribui com a saúde pública, com o intuito de reduzir e evitar a disseminação de sorotipos resistentes, mantendo a eficácia clínica desses antimicrobianos.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é determinada pela expressão de genes de resistência, que determinam o funcionamento dos mecanismos de resistência, maquinarias bioquímicas e/ou estruturais que promovem falha no mecanismo de ação do antimicrobiano. Dentre as falhas existentes, em relação a tratamento na causa de infecções a resistência bacteriana é um dos mais importantes, a propagação de microrganismos multirresistentes acarreta a necessidade de busca e desenvolvimento de novos antimicrobianos. Na tabela 2 estão listados os mecanismos de ação de todos os antimicrobianos avaliados neste estudo.

Tabela 2: Antimicrobianos utilizados para o teste de antibiograma e seus mecanismos de ação

Mecanismos de ação	Antimicrobianos
Inibidores da síntese da parede celular	Amoxicilina
	Ampicilina
	Imipenem
Inibidores da síntese de proteínas	Estreptomicina
	Cloranfenicol
	Tetraciclina
	Gentamicina
Inibidores da biossíntese de ácidos nucleicos (RNA e DNA)	Ciprofloxacina
	Ácido nalidíxico
	Norfloxacina
	Sulfazotrim
Inibição da síntese de metabólitos essenciais	Trimetroprim

Os antimicrobianos escolhidos no presente estudo para serem avaliados no teste de antibiograma atuam por diferentes mecanismos de ação. Baseados no perfil de resistência observado no nosso experimento, foi possível relacionar a classe dos antimicrobianos em que os sorotipos foram resistentes e os seus mecanismos de ação. As classes mais utilizadas normalmente, incluem β -lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, anfencóis, quinolonas, fluoroquinolonas e sulfonamidas (Moreno-Bondi et al., 2009).

O mecanismo de ação das tetraciclinas é bem estabelecido e há um consenso de que tetraciclinas se ligam a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, a adição de aminoácidos e, conseqüentemente, impedindo a síntese proteica (Pereira-Maia et al., 2010).

Na membrana plasmática das bactérias Gram-negativas encontram-se proteínas, caracterizadas como bombas de efluxo, que atuam na eliminação de substâncias tóxicas decorrentes do metabolismo bacteriano. Também atuam na ejeção dos antimicrobianos, impossibilitando que a sua concentração seja efetiva (transporte ativo do meio intracelular, para o extracelular) (Ribeiro, Cortina, 2016). Embora tenha predileção por diferentes classes de antimicrobianos, é relacionado principalmente as tetraciclinas e fluoroquinolonas (Baptista, 2013).

O desenvolvimento das quinolonas teve início com a identificação do ácido nalidíxico por Lesher e Cols em 1962, a partir de um subproduto da síntese da cloroquina, o 6-cloro-1-H-etil-4-oxoquinolona-3-ácido carboxílico (Machado et al., 2009). Devido sua atividade contra bactérias Gram-negativas aeróbias, o ácido nalidíxico foi uma boa opção terapêutica para o tratamento de infecções urinárias nos anos 60. Entretanto, sua considerável ligação proteica e as modestas concentrações séricas e teciduais, somadas ao surgimento de resistência, restringiram sua indicação ao tratamento de infecções sistêmicas (Barlow, 1963).

A replicação do DNA bacteriano tem início em uma sequência específica do cromossomo, e prossegue em sentido bidirecional até que as fitas se encontrem no lado oposto da molécula ou se deparem com sequências terminadoras da replicação. Diversas enzimas estão envolvidas nesse processo, entre elas a DNA-helicase que desenrola a dupla fita de DNA antes da atuação da DNA-polimerase, facilitando assim a progressão da replicação. No entanto, a ação combinada dessas enzimas resulta na formação de super espirais positivas no DNA em frente ao braço de replicação. Se esta super espiralização não for corrigida, pode impossibilitar a replicação (Pidcock, 1998).

Há muitas décadas as sulfonamidas têm sido uma classe de compostos de grande interesse farmacêutico. Elas apresentam um grande espectro de bioatividade e são bastante utilizadas na farmacologia devido a sua notória atividade antibacteriana. As sulfonamidas são, agentes bacteriostáticos que atuam como antimetabólitos do ácido paminobenzoico, substrato para a di-hidropteroato sintetase bacteriana, impedindo a formação do di-hidropteroato e, conseqüentemente, do N5, N10-metileno-tetra-hidrofolato (Patrick, 2005).

A *Salmonella* é um patógeno altamente adaptável, por isso pode estar presente na maioria dos produtos de origem animal e vegetal em nível mundial. O uso indiscriminado de antimicrobianos na avicultura exerce uma pressão seletiva, tornando assim mais fácil as cepas de *Salmonella* resistentes sobreviverem e serem transmitidas para os humanos por meio do consumo de alimentos. Portanto, é importante que se tenha um monitoramento contínuo da resistência e prevalência dessas bactérias, levando em consideração as implicações que a multirresistência pode causar a saúde (Perin, 2017).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a ocorrência da disseminação de *Salmonella enterica* isoladas de amostras de carcaças de frango obtidos de aviários do Oeste do Paraná, resistente a alguns antimicrobianos, apresentando resistência de 1 a 3 antimicrobianos. O sorotipo que apresentou maior resistência foi a *S. Newport*, resistente a Trimetropim, Sulfazotrim e Tetraciclina. Este fato pode acarretar a algumas implicações de saúde pública, devido a possibilidade de transferência de resistência a patógenos humanos por meio do consumo da carne de frango produzida por esses aviários.

A resistência bacteriana a vários antimicrobianos é uma preocupação constante das autoridades sanitárias, sendo necessário maior cuidado na administração de antimicrobianos em ambientes aviários.

REFERÊNCIAS

- [1] ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal Relatório anual de 2022. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2022>. Acesso em 20 jan 2023.
- [2] ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, Colonization and virulence Differences among Serovars. **The Scientific World Journal**, p.1-16, 2015.
- [3] ANTUNES, P. et al. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, n.22, p.110-121, 2016.
- [4] BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de resistência aos antibióticos. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso em Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

- [5] BARLOW, A. M. Nalidixic acid in infections of urinary tract. **British Medical Journal**, n. 5368, p.1308-1310, 1963.
- [6] BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. Brasília, 2003.
- [7] BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 31, de 29 de janeiro de 2002. Brasília, 2002. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos_agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/portaria-no-31-de-29-de-janeiro-de-2002.pdf/view. Acesso em 14 de Março de 2023.
- [8] CARDOSO, M. O. et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.299-302, 2006.
- [9] CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, M07-S11. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07>. Acesso em 23 de fevereiro de 2023.
- [10] DUARTE, D. A. M. et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.569-573, 2009.
- [11] FIGUEIREDO, R. et al. Resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella entérica* em alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n.585- 586, p.39-43, 2013.
- [12] KOTTWITZ, L. B. M. et al. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.2, p.496-498, 2008.
- [13] LIMA, E. T.; ANDREATTI-FILHO R. L.; PINTO J. P. A. N. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* isolados de produtos avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, n.2, p.394-400, 2009.
- [14] MACHADO, J. A. C. et al. Quinolonas: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.12, 2009.
- [15] MORENO-BONDI, M. C. et al. An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n.395, p.921-946, 2009.
- [16] PANDINI, J. A. et al. Occurrence and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* spp. serotypes isolated from poultry farms in Paraná, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, 2015.
- [17] PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. New York: Oxford University, 1995.
- [18] PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e Gliciliclinas: Uma visão geral. **Química Nova**, n.3, p.700-706, 2010.
- [19] PERIN, A. P. Ocorrência e quantificação de *Salmonella* sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no Estado do Paraná e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Mestrado em Ciência Animal – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017.
- [20] PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. **British Medical Journal**, n.7165, p.1029-1030, 1998.
- [21] RIBEIRO, M.; CORTINA, M. As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, n.1, p.1-12, 2016
- [22] SAEED, A. M.; NAIR, U. S. Use of molecular biological markers in the epidemiology study of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infections in humans and animals. **SAEED, AM Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals-epidemiology, pathogenesis and control**, v.1, p.161-170, 1999.
- [23] SANTOS, B. M. dos; MOREIRA, M. A. S.; DIAS, C. C. A. Manual de doenças avícolas. **UFV**, p. 224, 2008.
- [24] SILVA, C. F. da et al. *Salmonella* enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.1, p.1-8, 2014.

- [25] SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n.2, p.85-100, 2002.
- [26] WEGENER, H. C. et al. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum**, n.1, p.51-57, 1999.
- [27] XU, Z. et al. Prevalência e resistência antimicrobiana de *Salmonella* transmitida por carne de varejo no sul da China durante os anos 2009-2016: A diversidade da contaminação e a evolução da resistência de isolados multirresistentes. **International Journal of Food Microbiology**, n.333, p.108790, 2020.

Capítulo 6

Bioindicadores microbiológicos: ferramentas essenciais para a gestão sustentável dos recursos hídricos

Amanda Janaina Gonsatti Feitosa¹

Emanuel Sobocinski Zanini²

Gabrielle Jovana Antoniazzi³

Luana de Souza⁴

Maria Julia Lopes da Silva⁵

Fabiana Gisele da Silva Pinto⁶

Resumo: Preservar a qualidade da água é crucial para a saúde pública, exigindo avaliações precisas através de bioindicadores microbiológicos. Esses organismos, invisíveis a olho nu, revelam alterações na água e alertam para possíveis danos à saúde humana, indicando contaminação. A microbiologia desempenha um papel crucial neste contexto, destacando a importância de grupos específicos, como coliformes fecais termotolerantes, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp e microrganismos causadores de doenças em humanos. A presença de alguns desses bioindicadores indica contaminação fecal recente e pode sinalizar a existência de patógenos e deficiências nas condições sanitárias. O padrão de potabilidade exige ausência completa de coliformes totais e *E. coli* em 100 ml de água tratada. Além disso, protozoários como *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp, bem como adenovírus, representam ameaças à saúde humana e desafiam os métodos tradicionais de tratamento de água. A interligação entre a análise microbiológica e a segurança da água destaca a necessidade de monitorização constante destes bioindicadores para garantir a qualidade da água consumida e prevenir a propagação de doenças transmitidas pela água.

Palavras-chave: Água. Bioindicadores. Microbiologia.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-4902-0972>

² Laboratório de Química Aplicada e Ambiental/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-2236-3705>

³ Laboratório de Citogenética de Peixes/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-2250-2912>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0851-2161>

⁵ Laboratório de Ficologia (UNOPA)/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-8370-8623>

⁶ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>.

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso vital para a sobrevivência de todos os organismos na Terra, incluindo os seres humano. Portanto, a garantia da sua qualidade é essencial para a preservação da saúde pública e dos ecossistemas aquáticos. Nesse contexto, os bioindicadores microbiológicos desempenham um papel crucial na avaliação da qualidade da água.

Esses marcadores biológicos são organismos vivos, cujo objetivo é indicar a presença de alterações causadas pela poluição que pode causar danos à saúde humana e ao ecossistema (Brasil, 2004). Na avaliação da qualidade da água, os microrganismos, como bactérias, vírus e fungos, atuam como sinalizadores das condições sanitárias e ambientais do meio aquático.

Um dos principais benefícios dos bioindicadores microbiológicos é sua capacidade de indicar a contaminação fecal na água. Bactérias como *Escherichia coli* (*E. coli*) e coliformes termotolerantes são frequentemente utilizadas como indicadores, pois sua presença desses microrganismos em grande quantidade pode oferecer danos à saúde além de constatar que aquele recurso hidrográfico está poluído com matéria de origem fecal (Fernandes, 2015). A detecção desses organismos em níveis elevados pode alertar para a possível presença de patógenos causadores de doenças, indicando riscos à saúde pública.

Além disso, a monitorização contínua dos bioindicadores microbiológicos possibilita a identificação de fontes específicas de poluição e o rastreamento do impacto de atividades humanas no meio ambiente aquático. Isso é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de gestão e controle da qualidade da água.

Os bioindicadores também desempenham um papel fundamental na avaliação da eficácia de processos de tratamento de água. Ao monitorar a presença e a viabilidade desses organismos antes e depois do tratamento, é possível avaliar a eficácia dos métodos empregados e garantir que a água tratada atenda aos padrões de qualidade estabelecidos.

Em resumo, os bioindicadores microbiológicos são ferramentas valiosas na avaliação da qualidade da água, fornecendo informações cruciais sobre a presença de poluentes e riscos à saúde, visto que a água de má qualidade e exposta a contaminadores patogênicos podem causar doenças e até a morte dos indivíduos sem acesso a água dentro dos parâmetros microbiológicos, físicos e químicos de potabilidade e balneabilidade (Alves *et al.* 2016). Além do mais, sua utilização sistemática não apenas protege a saúde humana, mas também contribui para a preservação dos ecossistemas aquáticos. Investir na pesquisa e monitoramento desses indicadores é essencial para promover a gestão sustentável dos recursos hídricos e garantir um futuro mais saudável para as gerações vindouras.

Neste contexto, o presente capítulo teve por objetivo discorrer sobre, os principais grupos de microrganismos que influenciam a qualidade da água, a sua importância, e como a presença e quantidade interferem na potabilidade da mesma. Não basta saber que a água está límpida, translúcida, incolor, inodora, é necessário enxergar o que não é visto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA DA ÁGUA

A água, é um recurso indispensável para todas as formas de vida presentes neste planeta, representa 60% do peso corporal em humanos e pode atingir até 90% em plantas (Basso, 2014). Cerca de, 98% da água disponível no planeta é salgada, sendo encontrada nos oceanos e 2% do total de água disponível é doce, onde destes, 70% se encontram na atmosfera e geleiras e 30% nas águas superficiais e subterrâneas, sendo disponível diretamente para o consumo humano 0,3%, nas águas superficiais (Reis et al., 2021).

A característica de ser um solvente universal, possibilita com que a água se associe a muitas substâncias, até mesmo as contaminantes (Marin-Morales et al., 2016). De tal forma, a exposição através do consumo de água contaminada a agentes infecciosos, acarreta mudanças na qualidade de vida da sociedade, como doenças de veiculação hídrica, resultantes da presença de vírus, parasitas e bactérias, presentes na água contaminada, tendo como uma das fontes de sua contaminação, fezes de animais e de indivíduos já infectados (Daronco et al., 2020).

Por conta de sua vital importância para a vida na Terra, é de extrema necessidade a realização de testes bioindicadores microbiológicos, na água que será consumida por humanos e até mesmo animais. Os testes de determinação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, são alguns dos testes que podem ser realizados para avaliar a qualidade da água.

Os coliformes totais, são bactérias gram-negativas, facilmente encontradas nos recursos hídricos e solo. A *Escherichia coli*, tem seu gênero pertencente ao grupo dos coliformes totais, pode ser patogênica ou não dependendo da cepa, seu crescimento ocorre com altas temperaturas e está presente nas fezes de humanos e animais (Pulido et al., 2005; Harwood et al., 2014; Who, 2017).

No grupo dos coliformes termotolerantes, se tem como dominante o gênero *Escherichia*, além de *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* e *Citrobacter spp.*, que são bactérias ambientais, sendo inadmissível a presença de *E. coli* na água que será destinada para o consumo humano, já que a mesma provém de contaminação fecal (Harwood et al., 2014; Who, 2017).

Sendo assim, é de extrema importância o monitoramento e preservação da qualidade dos recursos hídricos, para sustentabilidade ambiental e segurança da população.

2.2. BIOINDICADORES MICROBIOLÓGICOS

Os bioindicadores são utilizados para avaliar a qualidade da água com o objetivo de conservá-la. Biomarcadores são organismos vivos que pretendem indicar a presença de alterações causadas pela poluição, que pode ser prejudicial à saúde humana e aos ecossistemas (Brasil, 2004). O termo bioindicador microbiológico, sugere que a presença desse tipo de organismo evidencia a contaminação da água e determina a presença de matéria fecal de origem entérica humana e de animais homeotérmicos (Filho & Silva, 2008).

As doenças de veiculação hídrica são transmitidas através da contaminação da água por bactérias, vírus e parasitas, que são eliminados pelas fezes de animais e humanos infectados. Quando ingeridos, esses patógenos passam pelo trato

gastrointestinal, onde completam seu ciclo infeccioso, sendo então eliminados nas fezes (Ríos-Tobón, 2017). Quando esses patógenos acessam a água, eles enfrentam barreiras naturais presentes ali, como pH e temperatura e outras tantas substâncias artificiais, como produtos utilizados nos processos de tratamento de água, esses tratamentos podem remover totalmente ou parcialmente esses contaminantes (Brasil, 2006).

Durante análises da qualidade de água são utilizados bioindicadores específicos, um exemplo são as bactérias do grupo coliformes (Silva et al., 2001). Os coliformes estão amplamente distribuídos pela natureza e se propagam facilmente na água, principalmente os coliformes termotolerantes que tem grande atenção da saúde pública por estarem associados a várias patologias que causam infecções intestinais humanas conhecidas. *Escherichia coli* é um coliforme termotolerante e é o indicador patogênico de origem fecal mais importante, não possui vida livre no ambiente e a sua presença indica a contaminação da água por fezes (Hofstra et al., 1988).

Além dos coliformes serem os principais causadores de infecções intestinais, podem ter participação em outras patologias: meningites, intoxicações alimentares, infecções urinárias e pneumonias. Outros gêneros como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, também são encontrados na água e no solo e são constituintes da microbiota intestinal dos vertebrados, e são caracterizadas como coliformes totais (Koneman et al. 2001). A análise microbiológica se mostra uma ferramenta importante para a determinação da qualidade da água (Brasil, 2005).

Os indicadores microbiológicos são microrganismos que possuem um comportamento semelhante aos microrganismos patogênicos e a sua presença determina a existência desses agentes, permitindo a comparação de suas reações às alterações físico-químicas, com a vantagem de ser mais facilmente cultivável, identificável e economicamente viável. Os bioindicadores microbiológicos devem seguir certos requisitos: ausência em águas não contaminadas e manter uma correlação de sua presença com a de patógenos, devem sobreviver na água por mais tempo e ser iguais ou mais resistentes que os patógenos, não serem patogênicos, e não devem se reproduzir em animais peçonhentos, ser encontrados constantemente em fezes e águas residuais, ser distribuídos aleatoriamente nas amostras e serem resistentes à inibição do seu crescimento por outros microrganismos (Vásquez et al., 2006).

Embora exibam a identificação e quantificação de microrganismos que qualificam a qualidade da água, não substituem as análises físico-químicas, mas reduzem custos e fornecem informações no monitoramento da qualidade da água (Vásquez et al., 2006).

2.3. PRINCIPAIS GRUPOS DE BIOINDICADORES MICROBIOLÓGICOS

Microrganismos com a capacidade de indicar a presença de alterações na água são denominados bioindicadores e são utilizados para avaliar a qualidade da água (Souto et al., 2015). Quando encontrados em grande quantidade podem oferecer danos à saúde humana e alertam que aquele corpo d'água está contaminado, portanto a análise da presença de contaminantes na água potável é essencial para a segurança de saúde pública (Saxena et al., 2014).

A contaminação do recurso hídrico pode ocorrer na fonte durante a distribuição ou nos reservatórios, entretanto higiene pessoal e ambiental também são fatores a serem levados em consideração para a proliferação de enfermidades de veiculação hídrica. Nos lugares onde as condições de saneamento básico são precárias, a água atua como veículo para a transmissão direta ou indireta de variados microrganismos (Souto et al., 2015).

Para ser utilizado como indicador microbiológico, o organismo deve indicar a presença de poluição fecal, de esgoto doméstico, de patógenos e ser eficiente ao demonstrar a eficácia da estação de tratamento. Os grupos de microrganismos bioindicadores reconhecidos e usados em estudos são: coliformes (totais e termotolerantes) incluindo *Escherichia coli*, bactérias do gênero *Enterococcus* e microrganismos causadores de doenças em humanos (Filho & Silva, 2008, Saxena et al., 2014).

No Brasil os parâmetros legais para avaliação microbiológica da água para consumo humano são coliformes totais e *E. coli*, sendo recomendado apenas em situações específicas a pesquisa de outros patógenos de veiculação hídrica (Brasil, 2004).

Coliformes termotolerantes são o grupo das bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, do tipo gram negativas, não esporuladas e em forma de bastonete, que fermentam lactose com formação de gás. Dentro deste grupo estão bactérias que divergem nas suas propriedades bioquímicas, sorológicas e quanto ao habitat, sendo elas: *Escherichia coli*, *Aerobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp. e outras encontradas mais raramente como a *Serratia* sp. (Souto et al., 2015).

A presença de coliformes totais na água não tratada não significa que o local está contaminado pois esse grupo de microrganismos é encontrado difundido no meio ambiente entretanto a presença de coliformes termotolerantes indica contaminação de origem fecal recente e podem indicar a presença de patógenos entéricos e deficiência de condições sanitárias próprias, essas bactérias são residentes do trato intestinal de animais homeotérmicos (Souto et al., 2015).

O padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano, água tratada e oriunda de sistemas de distribuição deve ser de total ausência de coliformes totais e de *E. coli* em 100 ml de amostra da água (Brasil, 2004).

Bactérias do gênero *Enterococcus* têm importância sanitária e podem ser usadas como indicadoras por estarem presentes nas fezes de animais, não se multiplicarem em águas contaminadas por esgoto e juntamente com coliformes totais podem determinar a fonte da contaminação fecal recente, humana ou animal (Souto et al., 2015). Este grupo de *Streptococcus* fecais tem alta tolerância a condições adversas de crescimento como sobreviverem a pH ácido e em ampla faixa de temperatura (10° a 45° C).

A presença da bactéria *Clostridium perfringens* nas fezes de todos os animais de sangue quente, assim como sua estabilidade e resistência a processos de desinfecção o tornam um definitivo indicador de contaminação de esgoto na água. Entretanto seus esporos são resistentes a estresses ambientais e sobrevivem por um longo período de tempo longe do local de contaminação o que os torna não recomendável para monitoramentos de rotina (WHO, 2017).

Giardia e *Cryptosporidium* são protozoários que causam gastroenterite e infecções intestinais, tais infecções são transmitidas pela via oral-fecal portanto a origem das doenças é a água contaminada. Sistemas de purificação de água podem falhar, pois os cistos da *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* tem potencial de sobreviver na água por meses e estudos comprovaram sua alta resistência a tratamentos convencionais com cloro e cloraminas (Castro-Hermida et al., 2015; Vernille et al., 2008).

Indicador viral da qualidade da água, o adenovírus, é um patógeno com resistência à luz UV que prevalece em águas residuais não tratadas durante todo o ano e causa doenças como gastroenterite, meningite e infecções respiratórias, sua presença é uma ameaça à saúde humana (Sendji et al., 2018). Suas propriedades para ser considerado indicador complementar para melhorar a avaliação da qualidade microbiológica da água são: estabilidade e resistência em variadas matrizes de água, sua maior abundância relativa a outros vírus entéricos, contínua detecção em esgotos e ter especificidade do hospedeiro humano (Lima et al., 2022; Rames et al., 2016).

2.4. MÉTODOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

Existem diferentes metodologias que podem ser empregadas para a análise microbiológica da água. Estas técnicas visam detectar contaminantes que possam estar presentes na água. As metodologias que serão descritas abaixo, visam atender as especificações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, publicação da *American Public Health Association* (APHA, 2017), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF).

Para a análise de coliformes totais e fecais nas amostras de água, uma das técnicas, é o método tradicional de tubos múltiplos. Nessa técnica, a amostra é inoculada em caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST), que estimula o crescimento de bactérias do grupo dos coliformes, causando a turvação do meio com formação de gás no tubo de Durham, incubados durante 48 horas, à 35°C. Após, é utilizado o meio seletivo para *Escherichia coli* (EC) que é um teste presuntivo para coliformes termotolerantes, e também o caldo verde brilhante (VB), que é um teste presuntivo para coliformes totais, para onde serão transferidas alçadas do caldo Lauril positivos, que permanecerão incubados durante 24 horas à 44,5°C. A avaliação positiva para presença de coliformes totais e termotolerantes, se dará pela turvação do caldo EC e VB com formação de gás (Rompré et al., 2002).

O número de coliformes totais e termotolerantes podem ser obtidos na tabela de Número mais Provável (NMP), baseado no número de tubos positivos do caldo VB e de caldo EC respectivamente, sendo os resultados expressos em NMP/100 mL.

Para a avaliação de presença da bactéria *Escherichia coli*, que é encontrada nas fezes de animais e humanos, sendo um indicativo de contaminação fecal da água, pode ser utilizada a metodologia utilizando o meio de cultura Ágar Eosina Metileno Azul (EMB), pois o crescimento dessas colônias de bactérias são identificadas pela coloração verde metálico.

Para o teste presuntivo de presença de *Enterococcus*, que é uma bactéria gram-positiva, presente no aparelho digestivo e urinário de mamíferos, pode ser utilizado a técnica com Caldo Azida Dextrose, para onde serão transferidas as amostras de água, e serão incubados durante 24 horas a 35°C, sendo consideradas positivas as que apresentarem crescimento nesse meio. Nasequência, será estriado uma alçada dos

tubos positivos para o meio de cultura Ágar Pfizer, seletivo para *Enterococcus*, sendo incubados a 35°C, em um período de 48 horas, sendo consideradas positivas as colônias com coloração castanho claro com halo marrom.

Outro método empregado para a análise de água é a contagem de bactérias aeróbios mesófilos heterotróficos, que tem seu crescimento otimizado em uma faixa de temperatura entre 26°C a 40°C. Para esta análise, é empregado o método de spread plate, por meio do espalhamento uniforme da solução em placas de petri, facilitando a contagem dessas bactérias. Para isso, é feita a diluição seriada da amostra, com salina, para depois fazer o plaqueamento em meio Ágar Nutriente (AN). As placas devem ser incubadas a 35°C, durante 48 horas, para depois realizar a contagem de crescimento dessas colônias, em UFC/mL.

Outra análise importante para ser realizada em amostras de água é a detecção de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Salmonella*. Estas bactérias, podem ser encontradas em alimentos e também na água, visto que também são repassadas através de fezes contaminadas. Esse teste, utiliza erlenmeyers com 90 mL de água peptonada 1%, para onde a amostra de água é transferida (0,2 mL da amostra), incubada à 36°C por 16 à 20 horas. Na sequência é transferido 1 mL da água peptonada tamponado, para um tubo que contenha 10 mL do Caldo Rappaport, que serão incubados à 41°C por 24 horas. Para o isolamento desses microrganismos, será necessário estriar uma alçada de cada tubo para placas com ágar sulfito bismuto (SB), ágar Hektoen-enteric (HE), e ágar Rambach (RAM) ou XLD ou XLT4 à 36°C de 24 à 48 horas. No meio SB ou XLD, as colônias com coloração do centro enegrecidas, são consideradas positivas para a presença de *Salmonella*, pois ocorre a produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S). No ágar (HE), as colônias ficam com coloração verde azuladas a azuis com ou sem centro enegrecido. Vale ressaltar que muitas culturas de *Salmonella* podem produzir colônias totalmente negras.

Estes procedimentos são realizados devido a legislações como a Portaria nº GM/MS N°888/2021, que estabelece critérios para controle e vigilância da qualidade da água, para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portanto, estas análises microbiológicas, são de extrema importância, visto que é através delas que podem ser identificadas possíveis contaminações da água.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A água apresenta uma importância crucial como um recurso vital para a sobrevivência de todos os organismos, incluindo o ser humano e garantir a qualidade da água é vital não apenas para a saúde pública, mas também para a preservação dos ecossistemas aquáticos. Nesse contexto, os bioindicadores microbiológicos emergem como ferramentas valiosas na avaliação da qualidade da água.

Os bioindicadores microbiológicos, principalmente microrganismos como bactérias e fungos, são organismos vivos sensíveis às condições ambientais, especialmente à presença de poluentes. Sua capacidade de indicar a contaminação fecal, com foco em bactérias como *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes, torna-os cruciais para alertar sobre possíveis riscos à saúde pública.

A monitorização contínua desses bioindicadores não apenas permite a identificação de fontes específicas de poluição, mas também rastreia o impacto das atividades humanas no meio ambiente aquático. Esse conhecimento é vital para o

desenvolvimento de estratégias eficazes de gestão e controle da qualidade da água.

Além disso, os bioindicadores desempenham um papel fundamental na avaliação da eficácia dos processos de tratamento de água. Ao monitorar a presença e a viabilidade desses organismos antes e depois do tratamento, é possível garantir que a água tratada atenda aos padrões de qualidade estabelecidos.

Em suma, o investimento na pesquisa e monitoramento desses bioindicadores é essencial para promover a gestão sustentável dos recursos hídricos e garantir um futuro mais saudável para as gerações futuras. A conclusão ressalta a importância de não apenas reconhecer visualmente a água, mas também compreender o que não é visível, enfatizando a necessidade de uma abordagem sistemática e científica para garantir a qualidade da água consumida pela sociedade.

REFERÊNCIAS

- [1] ALVES, FAGNER CARDOSO *et al.* Análise Microbiológica e parasitológica da água utilizada em hospital público do interior do estado de Rondônia. **Revista Uningá**, v. 49, n. 1, 2016.
- [2] APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22. ed. Washington: **American Public Health Association**, 2017.
- [3] BASSOI, L. J. Poluição das Águas. In: Júnior, Arlindo Philippi; PELICIONI, Maria Cecília Focesi (Orgs.) Educação Ambiental e Sustentabilidade. **Barueri, São Paulo: Manole**, 2014.
- [4] BRANDÃO, M. L. L.; ROSAS, C. O.; MEDEIROS, V. M.; WARNKEN, M. B.; BRICIO, S. M. L.; SILVA, A. M. L. Comparação das técnicas do NMP e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 71(1):32-9, 2012.
- [5] BRASIL. Portaria 888/2021. Portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, na forma do Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>>. Acesso em: 18 de set. 2023
- [6] BRASIL. Anexo XX da Portaria de Consolidação N° 5 do Ministério da Saúde de 03 de Outubro de 2017. **Ministério da Saúde**, 2017.
- [7] BRASIL. Portaria 1469/2000. Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade. Publicada no Diário Oficial da União n.º 59. **Ministério da saúde** seção 1, p. 266- 270, 2004.
- [8] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 275, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. DOU. **Ministério da Saúde**, 2005.
- [9] BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boas práticas no abastecimento de água: procedimentos para a minimização de riscos à saúde. Brasília: MS.252. **Ministério da Saúde**, 2006.
- [10] CASTRO-HERMIDA, J. A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: the need for safe drinking water. **The International Journal of Hygiene and Environmental Health** 218(1): 132-8, 2015. DOI: 10.1016/j.ijheh.2014.09.001.
- [11] DARONCO, C. R.; BÁRTA, R. L.; SILVA, J. A. G.; COLET, C. F.; STUMM, E. M. F. Bioindicadores alternativos da qualidade da água para consumo humano. **Research, Society and Development** v.9, n.9, e51996824, ISSN: 2525-3409, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.6824>.
- [12] FERNANDES, Kayo Cesar Bianco *et al.* **Detecção e quantificação de contaminação fecal hospedeiro-específico em águas destinadas ao abastecimento público**. Tese de Doutorado. 2015.
- [13] FILHO, F. M. A.; SILVA, L. M. Avaliações das concentrações de coliformes no afluente e efluente da ETE Goiânia em 2007. Dissertação (bacharelado em engenharia ambiental), **Universidade católica de**

goiás – Goiás, 2008.

- [14] HARWOOD, V. J.; STALEY, C.; BADGLEY, B. D.; BORGES, K.; KORAJKIC, A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. **FEMS Microbiology Reviews** 38 (1), 1–40, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12031>.
- [15] HOFSTRA, H.; HUISIN'T-VELD, J. H. J. Methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* including pathogenic strains. **Journal of Applied Bacteriology** 65(Suppl):197S-212S, 1988.
- [16] KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN J. R. W. C. Diagnóstico Microbiológico. 5a ed. Rio de Janeiro: **MEDSI** p.1465, 2001.
- [17] LIMA, F. S.; SCALIZE, P. S.; GABRIEL, E. F. M.; GOMES, R. P.; GAMA, A. R.; DEMOLINER, M.; SPILKI, F. R.; VIEIRA, J. D. G.; CARNEIRO, L. C. *Escherichia coli*, Species C Human Adenovirus, and Enterovirus in Water Samples Consumed in Rural Areas of Goiás, Brazil. **Food and Environmental Virology**, 14(1):77-88, 2022. DOI: 10.1007/s12560-021-09504-x.
- [18] MARIN-MORALES, M. A.; ROBERTO, M. M.; ANGELIS, D. F.; ANGELIS, D. A. Importância da água para a vida e garantia de manutenção da sua qualidade. CBMAI/DRM, UNICAMP, Paulínia, 2016.
- [19] PULIDO, M. P. A.; NAVIA, S. L.; TORRES, S. M. E.; PRIETO, A. C. G. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. **Nova Publicacion Científica** 3 (4), p.69-79, 2005. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.338>.
- [20] RAMES, E.; ROIKO, A.; STRATTON, H.; MACDONALD, J. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. **Water Resources** 96: 308-26, 2016. DOI: 10.1016/j.watres.2016.03.042.
- [21] REIS, R. A.; SANCHES, M. C.; MALDONADO, A. C. D. Água, fonte da vida. Brazilian **Journal of Development. Curitiba**, v.7, n.3, p.28287-28276, mar, 2021. ISSN: 2525-8761. DOI: 10.34117/bjdv7n3-512.
- [22] RIOS-TOBON, S.; AGUDELO-CADAVID, R. M.; GUTIERREZ-BUILES, L. Pathogens and Microbiological Indicators of the Quality of Water for Human Consumption. **Revista Facultad Nacional de Salud Pública**, 35(2), p.236-47, 2017. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>.
- [23] ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; DE-ROUBIN, M. R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging. **Journal of Microbiological Methods**, [S.l.], v.49, p.31-54, 2002.
- [24] SAXENA, G.; BHARAGAVA, R. N.; KAITHWAS, G.; RAJ, A. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. **Journal of Water Health**, 13(2): 319-29, 2015. DOI: 10.2166/wh.2014.275.
- [25] SEDJI, M. I.; VARBANOV, M.; MEO, M.; COLIN, M.; MATHIEU, L.; BERTRAND, I. Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. **Environmental Science and Pollution Research International** 25(30): 30497-30507, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-3045-4.
- [26] SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 2001
- [27] SOUTO, J. P.; LIRA, A. G. S.; FIGUEIRA, J. S.; DA SILVA, A. N.; SILVA, E. S. Poluição Fecal da água; Microrganismos indicadores. **IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**, 2015.
- [28] VÁSQUEZ, G.; CASTRO, G.; GONZÁLES, I.; PÉREZ, R.; CASTRO, T. Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. *ContactoS [Revista en Internet]*, 2006; (60): 41–8. Disponible en: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n60ne/Bio-agua.pdf>
- [29] VERNILLE, A.; NABI, A. Q.; BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; MASSA, S. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Italian water supplies. **Environmental Monitoring and Assessment** 152(1-4):203-7, 2009. DOI: 10.1007/s10661-008-0308-4.
- [30] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for drinking water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva, 542p., 2017.

Capítulo 7

Avaliação da qualidade microbiológica da água e sedimento no lago municipal de Cascavel-PR: perfil de resistência e potencial patogênico de microrganismos indicadores ambientais

Larissa de Assis Carretts¹

Adriá Braun Vieira²

Debora Marina Bandeira³

Fabiana Gisele da Silva Pinto⁴

Resumo: A preservação da qualidade ambiental assume um papel crucial na proteção da saúde humana, demandando a aplicação de métodos microbiológicos de elevada qualidade. Estes procedimentos revelam modificações no ambiente que indicam potenciais contaminações, capazes de desencadear eventos epidêmicos de menor escala. A microbiologia emerge como disciplina de extrema importância nesse cenário, conduzindo análises voltadas para a identificação de grupos microbiológicos, incluindo coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, e *Enterococcus* spp., microrganismos frequentemente associados a patogenicidade e resistência. O objetivo deste estudo consistiu na avaliação da qualidade ambiental, tanto na água quanto no sedimento, do lago municipal de Cascavel-PR, empregando métodos microbiológicos padrões para análise ambiental. Adicionalmente, buscou-se caracterizar o perfil de resistência desses microrganismos aos antibióticos comumente utilizados. Os resultados obtidos revelaram uma baixa qualidade nos parâmetros analisados, com a detecção de diversos microrganismos patogênicos. No perfil de resistência, observou-se que os microrganismos testados apresentaram resistência à Penicilina, Trimetropina e Cloranfenicol, enquanto se mostraram sensíveis apenas à Gentamicina. Este estudo ressalta a importância das análises microbiológicas ambientais como ferramenta fundamental na determinação da qualidade e segurança do ambiente, destacando a necessidade de medidas efetivas para mitigar potenciais riscos à saúde pública associados a contaminações microbiológicas.

Palavras-chave: Análises microbiológicas. Bioindicador. Água. Sedimentos. Qualidade ambiental.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-6987-9090>

² Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0006-9133-3784>

³ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-5956-7210>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>.

1. INTRODUÇÃO

A análise dos parâmetros de qualidade das águas superficiais, pelos critérios físico-químicos e geoquímicos estão sempre atrelados à utilização de bioindicadores, que nada mais é que a observação e estudo da espécie ou grupo indicador durante um intervalo de tempo, com o intuito de obter informações a respeito das condições do ambiente e mudanças nas comunidades biológicas (Pimenta et al., 2016).

Em estudos de monitoramento ambiental, os bioindicadores são organismos (ou partes de organismos ou comunidades de organismos) que podem ser usados na obtenção de informações sobre a qualidade do ambiente (ou parte do ambiente). Já os biomonitores são organismos que contêm informações sobre as características quantitativas da qualidade do ambiente (Becker et al., 2003; Pérez et al., 2019).

Na presença de agentes poluentes presentes na água, os microrganismos e suas populações são afetados, com isso são capazes de indicar o efeito, das ações antrópicas ou naturais no ambiente, o que permite uma avaliação biológica eficiente na identificação dos fatores atuantes (Pimenta et al., 2016; Ricardo et al., 2021).

Para Callisto e Moreno (2006) e Barik e colaboradores (2018), uma espécie indicadora é aquela que é dotada de uma pequena tolerância a alterações ambientais e, quando presentes em determinada área, revela um conjunto de condições particulares daquele ambiente. Em suma, a bioindicação são as relações estabelecidas entre os seres vivos e os fatores ambientais. As rápidas mudanças do ambiente causadas pelo ser humano provocam flutuações populacionais nos organismos. Cada espécie possui um padrão de variação característico: algumas são mais tolerantes, outras menos (García-Teh et al., 2022).

A detecção e quantificação de microrganismo patogênicos presentes na água é trabalhosa, demanda um tempo considerável, os custos são altos e nem sempre se obtêm resultados positivos ou que confirmem a presença dos microrganismos (Nnachi et al., 2022.). Os métodos convencionais de detecção de patógenos produziram resultados que levaram ao diagnóstico bem-sucedido de muitas bactérias patogênicas na água e meio ambiente, tais métodos requerem de 18 a 72 horas para crescer os patógenos a uma concentração que podem ser quantificados (Zeng et al., 2018).

O potencial da água potável para transmitir patógenos microbianos a muitas pessoas causando doenças subsequentes está bem documentado em muitos países em todos os níveis de desenvolvimento econômico (Leta; Dibaba, 2019).

A composição química das águas superficiais está associada a alterações no leito rochoso e compostos carreados pela erosão, com os quais interagem. Também há influência da deposição de partículas provenientes da atmosfera e de componentes da água da chuva (Lintern et al., 2018). A entrada de substâncias provenientes da ação humana nos cursos d'água, de forma contínua ou esporádica, alteram as concentrações das espécies dissolvidas e de microrganismos, podendo ser facilmente notadas (Patel et al., 2019).

Os elementos químicos metálicos e outras espécies químicas encontram-se dissolvidas nas águas intersticiais dos sedimentos do solo ou adsorvidos às superfícies das partículas sedimentares (Giraldo, 2018). As águas intersticiais são consideradas o reservatório do ambiente aquático em que os compostos dissolvidos são biodisponíveis e, por este motivo, importantes na avaliação ecotoxicológica (Ragnvaldsson et al., 2022). O acúmulo de íons metálicos acontece mais facilmente nas superfícies das partículas

sólidas e o efeito aditivo de diversos metais também podem acarretar toxicidade aos organismos aquáticos, especialmente os bentônicos (Vonk; Kraak, 2020; Butnariu, 2022).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar os parâmetros microbiológicos da água e do sedimento do Lago Municipal de Cascavel - PR, como fator de biomonitoramento da qualidade da água.

2. METODOLOGIA

2.1. LOCAL DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS

A área de estudo escolhida foi o Lago Municipal, inserido no Parque Ecológico Paulo Gorski, pertencente ao município de Cascavel, Paraná, Brasil. Foram coletadas duas amostras de água e de sedimentos em julho de 2023 seguindo as orientações estabelecidas pelo Guia nacional de coletas e preservação de amostras. Foram coletadas duas amostras de água e sedimentos, que foram acondicionadas em frascos de vidro de 300 mL, previamente esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121 °C por 15 min. Após a coleta das amostras, os frascos foram transportados em caixas isotérmicas para o laboratório encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Cascavel, para realização das análises necessárias e do isolamento e identificação das cepas microbianas.

2.2. CONTAGEM DE AERÓBIOS MESÓFILOS HETEROTRÓFICOS

A quantificação dos mesófilos heterotróficos foi realizada pela contagem padrão em placa, utilizando a técnica de semeadura em meio sólido “*Spread Plate*”. Foram feitas diluições decimais seriadas selecionadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e adicionou-se 0,1 mL dos inóculos em placas de Petri esterilizadas contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA). Homogeneizou-se com auxílio da alça de Drigalski, esperou-se secar e foram incubadas invertidas em estufa à 35°C por 48 horas. Após esse período, obteve-se a leitura das colônias.

2.3. ISOLAMENTO DE BOLORES E LEVEDURAS

No isolamento de bolores e leveduras foram preparados dois inóculos, de modo que para cada amostra, água e sedimento, foram retirados 10 mL e colocados em erlenmeyers com 90 mL de salina, que foram agitados durante 10 min a 28°C. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em solução salina 0.85% e adicionou-se 0,1 mL dos inóculos em placas de Petri esterilizadas contendo Ágar Batata Dextrose (BDA). Homogeneizou-se com auxílio da alça de Drigalski, esperou-se secar e foram incubadas invertidas em estufa à 25° C por 5 dias. Após esse período, obteve-se a leitura das colônias.

2.4. CONTAGEM DE ESPOROS - ISOLAMENTO DE *BACILLUS* SPP.

No isolamento de *Bacillus* spp. foi preparado dois inóculos, água e sedimento, que foram colocados 10 mL de cada u em dois erlenmeyers com 90 mL de salina, que foram agitados durante 10 min a 28°C, após isto foram colocados em estufa a 70° C por 8 min

para o choque térmico. Foram feitas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e adicionou-se 0,1 mL dos inóculos em placas de petri esterilizadas contendo Ágar Nutriente (AN). Homogeneizou-se com auxílio da alça de Drigalski, esperou-se secar e foram incubadas invertidas em estufa à 35° C por 48 horas. Após esse período, obteve-se a leitura das colônias.

2.5. CONTAGEM DE ESPOROS AERÓBIOS MESÓFILOS

A quantificação de esporos aeróbios mesófilos foi realizada pela contagem padrão em placa, utilizando-se técnica de semeadura em meio sólido “*Pour Plate*”. Foram feitas diluições decimais seriadas selecionadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), adicionados 1 mL dos inóculos em placas de Petri esterilizadas e após adicionados 15mL de AN, homogeneizou-se com movimentos circulares em formato de “8”, esperou-se solidificar e foram incubadas em estufa à 35°C por 48 horas. Após esse período, obteve-se a leitura das colônias.

2.6. IDENTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *ESCHERICHIA COLI* - TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Para a contagem de aeróbios mesofilos heterotróficos foi realizada diluição seriada, de água e sedimento, onde 25 mL das amostras foram adicionadas a um erlenmeyer contendo 225 mL de salina. Para as diluições 1 mL da amostra, já adicionada a salina, foi adicionado a um tubo contendo 9 mL de salina 0,85%, e para a segunda diluição foi adicionado 1 mL dessa segunda diluição a outro tubo contendo 9 mL de salina 0,85%, ficando nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente.

Para o teste de tubos múltiplos, foi retirado 1 mL de cada uma das concentrações e adicionadas a um tubo com Duran contendo meio LST, para observar a turbidez e a produção de gás, e foram incubados em estufa a 35°C por 24h. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Dos tubos que apresentaram característica positiva foi retirado 1 mL e adicionada a tubos com Duran contendo meio EC e meio VB, os tubos de EC foram incubados a 44°C por 24h e os tubos de VB foram incubados a 35°C por 24 hrs. Após esse período foi observado as características turbidez e produção de gás para os tubos positivos. Os tubos positivos para EC foram inoculados em placas de petri contendo meio EMB, e foram incubadas a 35 °C por 24 hrs. Após esse período, para identificação de *E. coli*, foi observado nas placas, colônias com coloração preta e aspecto verde brilhante.

Para a identificação bioquímica foi realizado a inoculação de colônias retiradas do meio EMB em tubos com diferentes meios, sendo eles, TSI, CITRATO, LISINA e MIO.

2.7. IDENTIFICAÇÃO DE *CLOSTRIDIUM SPP.* SULFITO REDUTORES E *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Para identificação de *Clostridium spp.*, 100 mL das amostras de água e de sedimento, foram submetidas a um choque térmico em estufa a 80°C por 10 min. Após esse período 10 mL de cada amostra foi adicionada a tubos contendo 10 mL de caldo DRCM, em concentração dupla, os tubos foram incubados a 35°C por 48h, em condições de anaerobiose. Os tubos positivos apresentaram escurecimento do meio.

Dos tubos com características positivas foi retirado 0,1 mL e adicionado em tubos contendo 10 mL de leite tornassolado (Litmus Milk), esses tubos também foram incubados a 35°C por 48h, em condições de anaerobiose. Os tubos positivos apresentaram característica de coagulação tempestuosa com formação de gás.

2.8. IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SPP. - TÉCNICA DE NMP

No isolamento de *Enterococcus* spp. foi inoculado uma série de tubos de Caldo Azida Dextrose em concentração dupla, com 5 mL de cada amostra. Os tubos foram incubados a 35°C por 24h. Após isto, os tubos com a presença de turvação foram passados por estriamento para placas com meio de cultura Ágar Pfizer, e incubadas em estufa a 35°C por 48h. Após esse período, observou-se a formação de colônias típicas castanhas escuras com halo marrom.

2.9. IDENTIFICAÇÃO DE *PSEUDOMONAS* SPP. - TÉCNICA DE NMP

No isolamento de *Pseudomonas* spp. foi inoculado uma série de tubos de Caldo Acetamida em concentração dupla, com 1 mL de cada amostra. Os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas. Após isto, os tubos com a presença de coloração púrpura foram passados por estriamento para placas com meio de cultura Ágar Leite, e incubadas em estufa a 35°C por 24h. Após esse período, observou-se a formação de colônias com halo de hidrólise de caseína e pigmento verde e amarelo.

2.10. IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. - PRESENÇA/AUSÊNCIA

Para detecção de *Salmonella* spp., foi retirado 25 mL de cada amostra, de água e de sedimento, e adicionado em 225 mL de água peptona 1%, que foi submetida a agitação em aparelho Shaker a 36°C por 24h, para o pré-enriquecimento da amostra. Após esse período foi transferido 1 mL de cada amostra para tubos contendo 10 mL de caldo Tetrionato e tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, esses tubos foram incubados a 36°C por 24h. Esse teste foi realizado em triplicata.

Dos tubos que apresentaram turbidez foi retirada uma alçada e estriada em placas de Petri contendo ágar Hektoen-enteric e ágar *Salmonella Shigella* (ágar SS), as placas foram incubadas a 36°C por 24h. Após esse período foram observadas as colônias positivas com característica enegrecida.

Para a identificação bioquímica foi realizado a inoculação de colônias retiradas do meio ágar SS em tubos com diferentes meios, sendo eles, TSI, CITRATO, LISINA e MIO.

2.11. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS - ANTIBIOGRAMA

Os microrganismos isolados nas técnicas anteriores: *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Salmonella* e *Pseudomonas* foram colocados para crescimento em caldo nutriente e incubados a 35°C por 24h. Após isto, foram adicionados 0,1 mL dos inóculos em tubos com 2 mL de salina, e passados com o uso de SWAB para placas com ágar Mueller-Hinton. Nas placas foram adicionados os discos de antibióticos, sendo eles: 1-Penicilina, 2-Trimetoprima, 3-Ampicilina, 4-Cloranfenicol, 5-Gentamicina, 6-Imipenem, 7-Ácido-nalidíxico, 8-Amoxicilina, 9-Neomicina, 10-Norfloxacin e incubadas em estufa a 35°C por

24h. Após esse período observou-se a formação de halos de inibição que foram medidos com o auxílio de uma régua.

3. RESULTADOS

3.1. CONTAGEM DE AERÓBIOS MESÓFILOS HETEROTRÓFICOS

Com relação as análises quantitativas, para a contagem de aeróbios mesófilos, após 24h de incubação, foi realizada a contagem de colônias em placa, onde para a amostra de água na concentração 10^{-1} foi observada a contagem de 37 colônias, já na amostra de sedimento não foi observada a presença de colônias na placa de petri.

3.2. ISOLAMENTO DE BOLORES E LEVEDURAS

Após cinco dias de incubação a avaliação das placas foi realizada. Foi possível verificar a presença de leveduras e bolores em todas as placas, tanto na amostra da água quanto sedimento. Sendo possível contar em ambas as amostras na concentração 10^{-1} com 20 colônias na amostra de água e 24 para amostra de sedimento.

3.3. CONTAGEM DE ESPOROS - ISOLAMENTO DE *BACILLUS* SPP.

As placas das amostras do sedimento e água foram avaliadas com 24 horas de incubação. Enquanto com este período de incubação não houve nenhum crescimento nas placas da água e sedimento, que ficaram por mais 24 horas para então realizar uma nova avaliação.

Para a amostra do sedimento, nas duas placas que continha à amostra diluída na 10^{-1} houve crescimento de colônias com característica de *Bacillus* spp. Ao realizar a coloração de Gram foi possível confirmar a presença de Bacilo Gram negativo e Bacilo Gram positivo. Nas placas com a diluição 10^{-2} houve a confirmação através da coloração de Gram da presença de Bacilo Gram Negativo. Nas placas contendo a diluição na 10^{-3} não houve crescimento de colônias, a diluição pode ter sido muito alta não contendo microrganismos.

Para as amostras da água, não houve crescimento característico de colônias de *Bacillus* spp. em nenhuma das placas mesmo com 48 horas de incubação, podendo ter como justificativa a presença em baixo nível de esporos na água onde as diluições foram muito altas resultando na ausência de colônias.

3.4. CONTAGEM DE ESPOROS AERÓBIOS MESÓFILOS

A presença de esporos aeróbios mesófilos foi observada em todas as placas que foram inoculadas com amostra de água e para amostra de água, não foi observado crescimento na concentração de 100 μ L, foi realizada a coloração de Gram para identificação dos microrganismos, onde foi observada a presença de bacilos Gram positivo de solo na amostra de sedimento.

3.5. COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *ESCHERICHIA COLI* - TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

A presença de coliformes totais é com base nos tubos contendo meio de cultura VB, a confirmação da presença desses microrganismos nas amostras de água e sedimento foi mostrada pela turvação do caldo e a produção de gás no interior do tubo de Durham. A presença de coliformes termotolerantes é baseada nos tubos contendo caldo EC que também apresentou turvação do caldo e presença de gás no interior do Durham.

Com relação aos coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*, para a amostra de sedimento foi observado que para a concentração de 10^{-1} três dos tubos foram positivos para esses microrganismos, para a concentração 10^{-2} três tubos foram positivos para amostra de sedimento, e para a concentração 10^{-3} nenhum tubo foi positivo, de acordo com a tabela de número mais provável, a amostra de sedimento apresentou 17 NMP/100ml. Para a amostra de água foi observado que para a concentração 10^{-1} três tubos foram positivos para esses microrganismos, para a concentração 10^{-2} dois tubos foram positivos e para a concentração 10^{-3} , nenhum tubo foi positivo, sendo que de acordo com a tabela de número mais provável, o resultado foi de 14 NMP/100ml.

Os tubos positivos, que apresentaram turbidez e formação de gás no tubo de Durham, foram estriados em placas de EMB, onde todos apresentaram colônias verde brilhante, característica de *E. coli*, apresentando, assim, resultado positivo para presença desses microrganismos nas amostras. Os testes bioquímicos realizados também comprovaram a presença do microrganismo tanto na água quanto no sedimento (Tabela 1).

Tabela 1 – Testes bioquímicos confirmatórios

Testes Bioquímicos	
Fenilalanina	Negativo
TSI	
KIA	Ácida
H₂S	Negativo
Gás (Bolhas)	Bolhas
Citrato	Positivo
MIO	
Motilidade	Positivo
Indol	Positivo
Ornitina	Positivo
Lisina	Amarelo – Negativo

Fonte: as autoras (2022). TSI - Triple Sugar Iron Agar; H₂S - teste de sulfeto de hidrogênio.

3.6. *CLOSTRIDIUM* SULFITO REDUTORES E *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Foi confirmado a presença de *Clostridium* nas amostras de água e sedimento, o que mostra que o choque térmico em que as amostras foram submetidas, foi capaz de quebrar

a dormência dos esporos. Esta presença foi identificada através do escurecimento do meio de cultura Caldo DRCM. Também ocorreu a formação de coágulo, acidificação e a formação de gás (rompimento do coágulo) no meio Litmus Milk evidenciando o crescimento do microrganismo em questão.

3.7. *ENTEROCOCCUS* - (NMP)

A presença de *Enterococcus* não foi observada nos tubos com 24 horas de incubação, porém após 48 horas de incubação foi apresentado resultado positivo para presença de *Enterococcus* nas amostras de água e de sedimento. As amostras que apresentaram turbidez no tubo foram estriadas em placas de petri com meio Pfizer, sendo que todas apresentaram resultado positivo, sendo que as colônias nesse meio apresentaram coloração castanha escura e halo marrom.

3.8. *PSEUDOMONAS* - (NMP)

Através das análises foi possível verificar que houve presença de *Pseudomonas* spp. em ambas as amostras devido a degradação do Ágar-Leite, porém não se trata de *Pseudomonas aeruginosa* devido ao fato que no caldo Acetamida obteve-se coloração vermelha, indicando resultado negativo para *P. aeruginosa*.

3.9. *SALMONELLA* - PRESENÇA/AUSÊNCIA

A presença de *Salmonella* foi confirmada nas amostras de água e sedimento, os tubos apresentaram turbidez e quando estriadas nas placas de petri contendo meio XLD e SS apresentaram as características exclusivas para esses microrganismos. Obtendo confirmação através dos testes bioquímicos realizados (Tabela 2).

Tabela 2 – Testes bioquímicos confirmatórios para *Salmonella* spp

Testes Bioquímicos	
Fenilalanina	Negativo
TSI	
KIA	Alcalino
H₂S	Positivo
Gás (Bolhas)	Bolhas
Citrato	Negativo
MIO	
Motilidade	Positivo
Indol	Positivo
Ornitina	Positivo
Lisina	Roxo – Positivo

Fonte: as autoras (2022). TSI - Triple Sugar Iron Agar; H₂S - teste de sulfeto de hidrogênio.

3.10. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS - ANTIBIOGRAMA

Os resultados revelaram padrões no perfil de resistência das cepas testadas (Quadro 1). Entre as cinco cepas testadas, *Pseudomonas* sp., apresentou maior resistência aos antimicrobianos testados, sendo sensível apenas para Gentamicina (Figura 1), seguida de *Enterococcus* sp. com resistência a seis antimicrobianos (Figura 2), a *Salmonella* sp. foi resistente a cinco antimicrobianos (Figura 3), *Bacillus* sp. a quatro antimicrobianos (Figura 4) e *E. coli* resistente a apenas um antimicrobiano, a Penicilina (Figura 5).

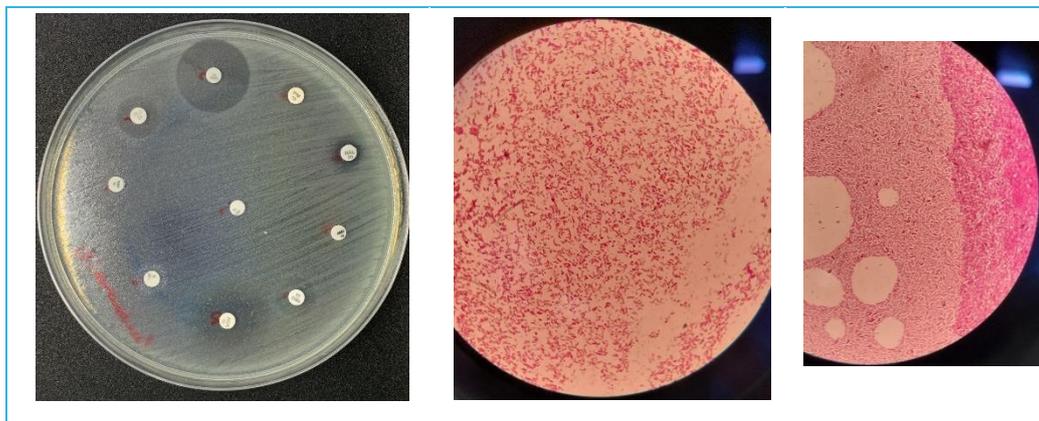
Quadro 1 – Perfil de resistência das cepas testadas no método de antibiograma

Antibimicrobiano/ Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas</i>
1-Penicilina	R	R	R	R	R
2-Trimetoprima	S	R	R	R	R
3-Ampicilina	S	S	S	R	R
4-Cloranfenicol	S	R	R	R	R
5-Gentamicina	S	S	S	S	S
6-Imipenem	S	S	S	S	R
7-Ácido nalidíxico	S	R	S	S	R
8-Amoxicilina	S	S	R	R	R
9-Neomicina	S	R	S	S	R
10-Norfloxacina	S	R	S	S	R

Fonte: as autoras (2022).

As cinco cepas bacterianas testadas indicam persistência na resistência aos antimicrobianos de maior espectro e todas apresentaram suscetibilidade a Gentamicina que pertence a classe dos aminoglicosídeos, o que o torna eficaz contra estes microrganismos patogênicos.

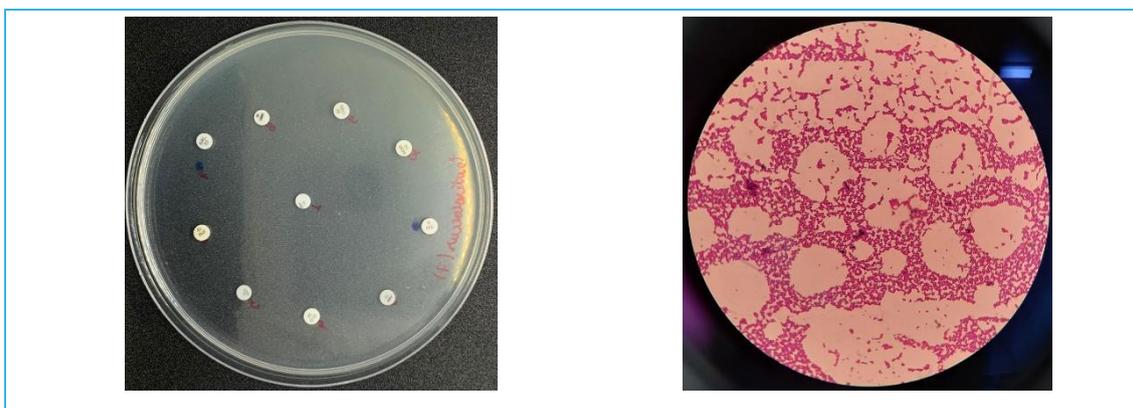
Figura 1 – Teste de antibiograma (À ESQUERDA); Lâmina de *Pseudomonas* sp. submetida a coloração de Gram (À DIREITA)



Fonte: As autoras (2022).

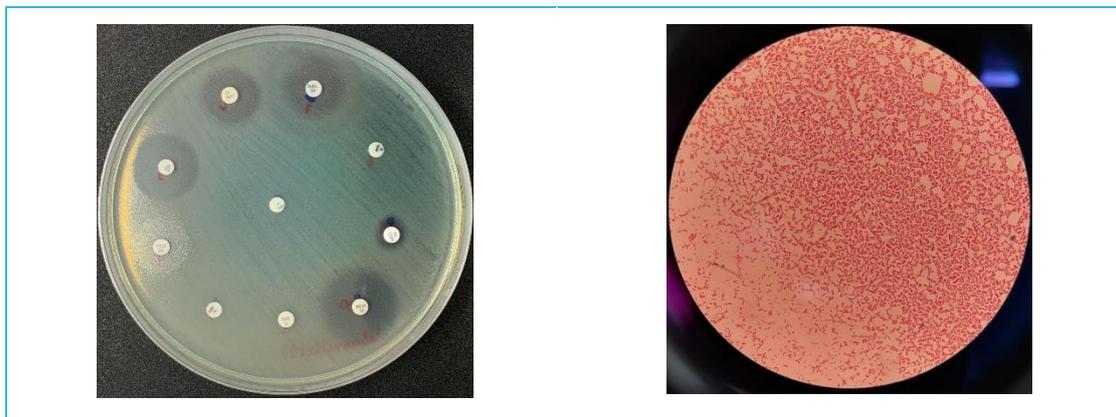
No geral, observou-se um padrão em relação ao perfil de resistência e suscetibilidade aos antimicrobianos. Entretanto, as cinco cepas apresentaram resistência a Penicilina, seguidas de Trimetoprima, Clorafenicol e Amoxicilina, antimicrobianos estes comumente utilizados no tratamento de doenças causados por estes microrganismos. Essa resistência pode ser sugestiva de que os microrganismos podem se adaptar ao ambiente (água e sedimento) podendo estar correlacionado com a expressão de genes que conferem resistência a antimicrobianos.

Figura 2 - Teste de antibiograma (À ESQUERDA); Lâmina de *Enterococcus* sp. submetida a coloração de Gram (À DIREITA)



Fonte: As autoras (2022).

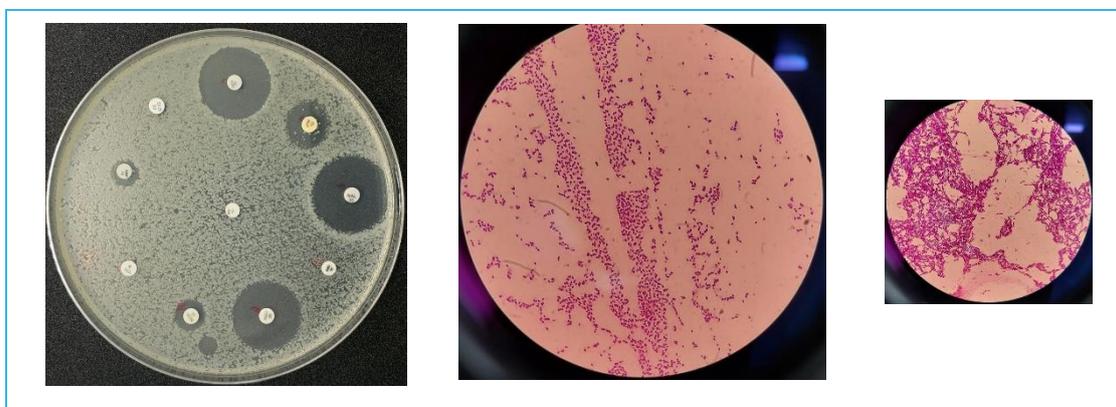
Figura 3 - Teste de antibiograma (À ESQUERDA); Lâmina de *Salmonella* submetida a coloração de Gram (À DIREITA)



Fonte: As autoras (2022).

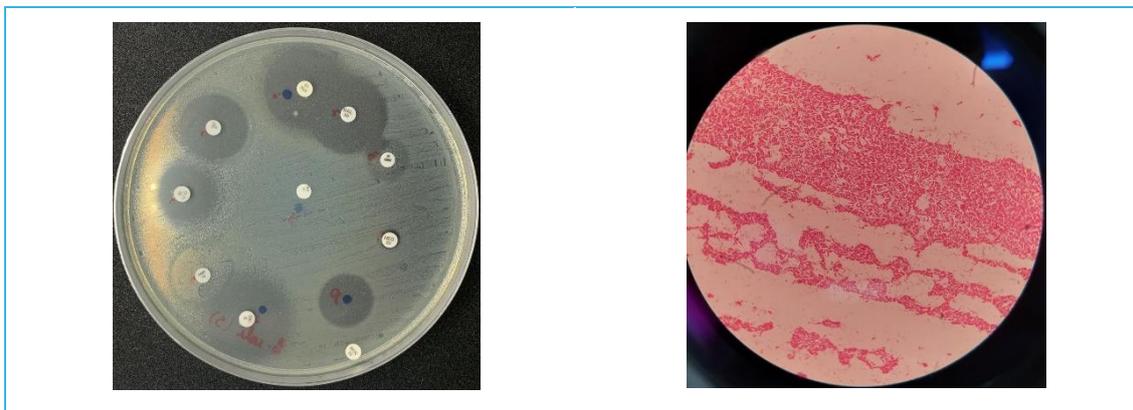
Em suma, os padrões de resistência e suscetibilidade observados destacam a complexidade das interações entre os microrganismos no ambiente. A resistência bacteriana aos antimicrobianos de amplo espectro observada, reforça a importância do uso responsável desses medicamentos para evitar a disseminação da resistência.

Figura 4 Teste de antibiograma (À ESQUERDA); Lâminas de *Salmonella* submetida a coloração de Gram (À DIREITA)



Fonte: As autoras (2022).

Figura 5 - Teste de antibiograma (À ESQUERDA); Lâminas de *Escherichia coli* submetida a coloração de Gram (À DIREITA)



Fonte: As autoras (2022).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio das análises conduzidas, foi constatado que tanto a água quanto o sedimento do Lago Municipal de Cascavel demonstram baixa qualidade, evidenciada pela presença de diversos microrganismos patogênicos, os quais também desempenham o papel de indicadores de contaminação fecal ambiental. Com base nos resultados obtidos, é possível inferir que a utilização de bioindicadores e biomonitores desempenha um papel crucial na avaliação da qualidade das águas superficiais, proporcionando informações valiosas sobre as condições ambientais e alterações nas comunidades biológicas. A presença de agentes poluentes na água impacta significativamente os microrganismos, tornando-os indicadores eficazes das ações antrópicas ou naturais no ambiente. A bioindicação, conforme observada nas flutuações populacionais em resposta às rápidas mudanças ambientais, destaca a importância da compreensão dos padrões de variação específicos de cada espécie. Além disso, a detecção e quantificação de microrganismo patogênicos na água, embora desafiadora e custosa, é crucial para a segurança da água potável, dada a documentada capacidade de transmissão de patógenos microbianos e a potencial ocorrência de doenças associadas. As alterações na composição química das águas superficiais, decorrentes de atividades humanas, influenciam diretamente as concentrações de espécies dissolvidas e microrganismos, evidenciando a importância da monitorização contínua. A presença de elementos químicos metálicos nas águas intersticiais dos sedimentos, destaca-se como um indicador crítico para avaliações ecotoxicológicas, ressaltando o potencial acumulativo desses metais nas superfícies sólidas e seus efeitos tóxicos, especialmente sobre organismos bentônicos. Essas conclusões ressaltam a necessidade de abordagens integradas e contínuas para a gestão eficaz da qualidade das águas superficiais, considerando a complexidade das interações ambientais.

REFERÊNCIAS

- [1] BARIK, J. *et al.* Distribuição de espécies de mangue e salinidade da água: uma abordagem de espécies indicadoras para Sundarban. **Journal of Coastal Conservation**, v.22, pp. 361–368, 2018.
- [2] BECKER, P. H. *et al.* Bioindicators and Biomonitoring—Principles. **Concepts and Applications**, 2003.
- [3] BUTNARIU, Mônica. Metais pesados como poluentes no ecossistema aquático do Mar Negro. In: **Doenças Bacterianas dos Peixes**. Imprensa Acadêmica. pp. 31-57, 2022.
- [4] GARCÍA-TEH, J. G. *et al.* Infra comunidades de metazoários parasitas do Tomtate Grunt (*Haemulon aurolineatum*) como potenciais bioindicadores de condições ambientais na plataforma continental de Yucatán, México. **Boletim de Contaminação Ambiental e Toxicologia**, v. 108, n. 1, pp. 49-54, 2022.
- [5] GIRALDO, Juan Pablo Salazar. Aplicação do Fracionamento Geoquímico de Metais em Sedimentos para Análise Ambiental de um Reservatório de Água. Caso Riogrande Ii (Antioquia-Colômbia). Em: **Fracionamento**. Intech Open, 2018.
- [6] LETA, M. K.; DIBABA, W. T. Avaliação dos parâmetros físico-químicos do rio Awetu, Jimma, Oromia, Etiópia. **Journal of Water Sustainability**, v. 9, n. 1, pp. 13-21, 2019.
- [7] LINTERN, A. *et al.* Fatores-chave que influenciam as diferenças na qualidade da água do córrego através do espaço. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Water**, v. 5, n. 1, pp. e1260, 2018.
- [8] NNACHI, R. C. *et al.* Progressos recentes em biossensores para detecção rápida de patógenos bacterianos em água, alimentos e meio ambiente. **Ambiente Internacional**, p. 107357, 2022.
- [9] PATEL, M. *et al.* Produtos farmacêuticos de interesse emergente em sistemas aquáticos: química, ocorrência, efeitos e métodos de remoção. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 6, pp. 3510-3673, 2019.
- [10] PÉREZ, S. *et al.* Lapas (*Patella* spp. *Mollusca*, *Gastropoda*) como organismos modelo para o biomonitoramento da qualidade ambiental. **Indicadores Ecológicos**, v. 101, pp. 150-162, 2019.
- [11] PIMENTA, S. M. *et al.* Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science. **Ambiente & Água: An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, [S.L.] Taubaté, v. 11, n. 1, pp. 198-210, 19 nov. 2016. Mensal. Instituto de Pesquisas Ambientais em Bacias Hidrográficas (IPABHi). <http://dx.doi.org/10.4136/1980-993x>. Disponível em: www.ambi-agua.net. Acesso em: 28 set. 2022.
- [12] RAGNALDSSON, D. *et al.* Aplicando Critérios Genéricos de Qualidade da Água para Cu e Zn em um Ambiente Aquático Dinâmico—O Caso da Formação de Água Salobra Strömmen-Saltsjön. **Água**, v. 14, n. 6, pp. 847, 2022.
- [13] RICARDO, I. A. *et al.* Uma revisão crítica sobre microplásticos, interação com poluentes orgânicos e inorgânicos, impactos e eficácia de processos oxidativos avançados aplicados para sua remoção de matrizes aquosas. **Chemical Engineering Journal**, v. 424, pp. 130282, 2021.
- [14] VONK, J. A.; KRAAK, M. H. S. Exposição a herbicidas e toxicidade para produtores primários aquáticos. **Revisões de Contaminação Ambiental e Toxicologia**, v. 250, pp. 119-171, 2020.
- [15] ZENG, L.; WANG, L.; HU, J.. Current and emerging technologies for rapid detection of pathogens. **Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens-A Prospective Way for Rapid Analysis**, v. 73178, pp. 6-19, 2018.

Capítulo 8

Explorando o potencial agrícola do Paraná: prospecção e caracterização de rizobactérias isoladas do Parque Estadual do Guartelá

Luana de Souza¹

Debora Marina Bandeira²

Camila Vogt dos Santos³

Débora Pedroso⁴

Jaíne Freita de Souza⁵

Mayara Maria de Souza⁶

Fabiana Gisele da Silva Pinto⁷

Resumo: A necessidade de encontrar opções mais sustentáveis na agricultura torna-se urgente devido à utilização excessiva de fertilizantes nitrogenados. Uma estratégia promissora para impulsionar a produtividade de culturas economicamente relevantes é a implementação da inoculação com Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs). Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi realizar a prospecção e caracterização de rizobactérias isoladas de solos nativos do Paraná, no Parque Estadual do Guartelá, com potencial de promover crescimento vegetal. Foram isoladas sete bactérias de raízes de plantas do Parque Estadual do Guartelá, e quinze bactérias de planta-isca (feijão e milho) cultivados em solos coletados do Guartelá. Quanto a caracterização dos isolados, observou-se que a maioria foram bacilos, Gram negativos, com colônia de forma circular, com elevação plana, borda inteira com superfície lisa e pouca produção de muco, com consistência aquosa. Quanto a solubilização de fosfato e potássio, somente nos isolados a partir de planta-isca foram observados esse potencial, sendo os isolados 19 e 20, solubilizadores de fosfato e o isolado 14 solubilizador de potássio.

Palavras-chave: Rizobactérias. Prospecção. Bactérias promotoras de crescimento de plantas.

¹ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0851-2161>

² Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-5956-7210>

³ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0001-7566-8003>

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0004-0856-4916>

⁵ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0004-6309-411X>

⁶ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0009-0000-0444-1442>

⁷ Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI)/ Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais (PPRN)/Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)/Cascavel - PR <https://orcid.org/0000-0002-0486-8486>

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento do uso de fertilizantes nitrogenados, torna-se urgente a busca por alternativas mais sustentáveis na agricultura. Essa necessidade surge da crescente compreensão dos impactos negativos do uso indiscriminado desses fertilizantes na saúde do solo, na qualidade da água e na emissão de gases de efeito estufa. Sendo assim, medidas mais eficientes e menos agressivas ao meio ambiente, são práticas que devem ser empregadas (Boswell et al., 1985; Hamid et al., 2021; Liu et al., 2021; Molajou et al., 2021; Yao et al., 2021).

Uma alternativa adicional para incrementar a produtividade das culturas economicamente importantes, reside na aplicação de inoculação de culturas com Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs). Estas bactérias são habitualmente encontradas tanto na rizosfera quanto no interior das raízes das plantas, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento e crescimento vegetal. Os benefícios proporcionados por esta prática são manifestados através da produção de substâncias que contribuem para diversos mecanismos fisiológicos da planta, como por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018; Ikeda et al., 2020; Mahmud et al., 2020; Moretti et al., 2020); a produção de sideróforos (Zarei et al., 2019; Kour et al., 2020; Puri; Padda; Chanway, 2020; Torres et al., 2020); solubilização de fosfato (SF) e potássio (SK) (Lyu et al., 2016) produção de ácido indol-3-acético (AIA) (Puente et al., 2018), substituindo o efeito e o uso de muitos fertilizantes.

Dessa forma, torna-se interessante o estudo de microrganismos em locais nativos e preservados. A Unidade de Conservação do Parque Estadual do Guartelá (PEG), está localizado no município de Tibagi, no segundo Planalto do Estado do Paraná, nas coordenadas 24°39'10"S e 50°15'25"W. Tem como limite Norte e Leste o rio Iapó, ao Sudeste o riacho do Pedregulho e ao Noroeste, propriedades particulares. O clima dessa região é considerado subtropical úmido quente. Os solos dos Campos Gerais, são pouco profundos, predominando os Cambissolos e os Litossolos (Neossolos Litólicos) constituídos de areia esbranquiçada proveniente da decomposição do arenito Furnas (Klein & Hatschbach, 1971). Nos locais com pouco escoamento, formam-se solos cinzento-escuros a pretos, ricos em matéria orgânica (Rocha, 1995).

A área apresenta elevado interesse ecológico, devido à grande variação ambiental e vegetacional, coexistindo vários ecossistemas. Portanto, é um local importante para isolamento de bactérias que possam ter potencial de promoção de crescimento vegetal. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi realizar a prospecção e caracterização de rizobactérias isoladas de solos nativos do Paraná, no Parque Estadual do Guartelá, com potencial de promover o crescimento vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCPS)

Ao longo da evolução do mundo, as plantas desenvolveram algumas adaptações, que contribuem para a sua sobrevivência. Nesse sentido, elas apresentam interações com microrganismos, que auxiliam na absorção de nutrientes, além de desempenharem papel de proteção contra fitopatógenos (fungos, oomicetos, bactérias, vírus, protozoários e nematóides) e herbívoros (Lynch e Whipps, 1990).

Com a busca de uma agricultura mais sustentável, a utilização de bactérias como estimulantes no desenvolvimento das plantas, são alternativas possíveis e viáveis para melhor expressão do potencial genético das plantas. Sabe-se que a rizosfera, é uma porção do solo altamente dinâmica, onde o contato de raízes com microrganismos benéficos e patogênicos, interagem entre si, através de produção e secreção de substâncias químicas. Alguns desses microrganismos que crescem próximos as raízes presentes na rizosfera, denominados como rizobactérias, possuem a capacidade de sintetizar fosfatos minerais, fornecer ou aumentar a produção de ácido-indolacético, promover a fixação associativa de nitrogênio, produzir sideróforos e outros compostos, auxiliando no desenvolvimento dessas plantas, e sendo caracterizados como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (Cattelan, 1999; Moreira e Siqueira, 2006).

O grupo das RPCPs, é bastante diversificado, sendo essas bactérias classificadas de acordo com o seu efeito no crescimento vegetal. Dessa forma são classificadas em benéficas, deletérias ou neutras (Dobbelaere et al., 2003; Pereira et al., 2008). As rizobactérias com efeito benéfico nas plantas, auxiliam na qualidade do crescimento das plantas, além disso podem adaptar-se as diferentes condições climáticas, por serem altamente resistentes a diferentes fatores abióticos, como temperatura, pH e umidade. Dessa forma, são alternativas viáveis para desempenharem funções de proteção celular, contra por exemplo, o dessecamento dessas plantas (Kavamura, 2012).

Dentre os principais microrganismos relatados como promotores de crescimento estão os gêneros: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Azospirillum brasilense*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, entre outras, (Longhini et al., 2016; Lin et al., 2018; Leite et al., 2019; Pereira et al., 2019; Silveira et al., 2019; Souza et al., 2019; Zaheer et al., 2019; Narayanasamy; Thangappan; Uthandi, 2020).

2.2. SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO E FOSFATO

O potássio (K) é um cátion com grande mobilidade nas plantas, sendo o segundo nutriente essencial mais absorvido pelos vegetais. Desempenha funções importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas, ativando mais de 60 enzimas, como por exemplo, sintetases, cinases, desidrogenases e transferases. Além disso, desempenha diferentes funções enzimáticas em processos metabólicos da planta, como fotossíntese (Wang et al., 2012), síntese de proteínas e carboidratos (Prajapati e Modi, 2012), regulação dos estômatos (Hedrich, 2012) além de tolerância a seca (Grzebisz et al., 2013).

Na cultura do feijão, o nitrogênio, potássio e fosfato desempenham funções importantes em seu desenvolvimento e produtividade. A dosagem certa de potássio aumenta a produtividade do feijoeiro, pois, sua ausência prejudica processos metabólicos das plantas, aparecendo por exemplo, folhas amareladas (Oliveira, 2009).

O potássio pode ser classificado de acordo com Zorb; Senbayram; Peiter (2014), em quatro diferentes grupos, conforme sua disponibilidade para as plantas. Primeiro, como potássio solúvel, disponível para as plantas e microrganismos, porém sujeito a lixiviação. Segundo, como potássio trocável, infiltrado nos argilominerais e coloides orgânicos do solo. Terceiro, potássio não trocável, mantido fortemente por ligações de alta energia à argilominerais ou minerais primários. Quarto, potássio estrutural,

incorporado a minerais como feldspato e micas, sendo as micas, pouco disponíveis as plantas.

Já o macronutriente fósforo (P), também é muito importante nas funções fisiológicas das plantas e não está altamente disponível, por isso, utiliza-se fertilizantes fosfatados, para os fosfatos serem utilizados pelas plantas. Porém, uma pequena parte dos fosfatos fica disponível, e a maior parte interage com outras moléculas do solo, formando complexos insolúveis, levando a necessidade constante de utilização desses fertilizantes (Novais e Smyt, 1999).

Dessa forma, já existem estratégias de utilização de fosfatos de rochas (FR) para as culturas, além de buscas por microrganismos solubilizadores de fosfato, que além de facilitarem a disponibilidade desse macronutriente, não são agressivos ao meio ambiente e auxiliam no desenvolvimento dessa cultura (Rajapaksha et al., 2011).

A atividade bioquímica de RPCV, é uma das alternativas sustentáveis para obtenção do fósforo pelas plantas, pois possuem mecanismos facilitadores desse processo, como produção de expolissacarídeos, sideróforos, e principalmente, pela produção de ácidos orgânicos (Souchie et al., 2005). Sabe-se que diversos rizóbios, além de fixar nitrogênio atmosférico, conseguem solubilizar fosfatos, sendo uma estratégia interessante de uso na agricultura (Rodriguez e Fraga, 1999).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram executados no período de Outubro de 2022 a Outubro de 2023 no Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI), na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, no campus de Cascavel – PR.

Os isolados bacterianos foram isolados de nódulos ou raízes de plantas, e também através do processo de utilização de planta-isca em diferentes tipos de solo, utilizando a solução nutritiva de Norris (Vincent, 1970).

3.1. LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM

As amostras de solo e de plantas foram coletadas na Unidade de Conservação do Parque Estadual do Guartelá, no município de Tibagi – PR. Ao total foram coletadas cinco amostras, sendo que cada amostra foi composta por cinco pontos distintos, a uma distância de até cinco metros, sendo homogeneizadas.

As amostras de solo e de plantas, foram coletadas com o auxílio de uma pá de jardinagem, sendo transferidas em um saco plástico tipo zip loc, que foi transportado em uma caixa de isopor, até o laboratório (Hungria e Silva 2011).

Essas amostras foram utilizadas para realizar o isolamento de bactérias através da maceração de raízes e retirada de nódulos de plantas-iscas.

3.2. ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS A PARTIR DE PLANTA-ISCA

Para a utilização de planta-isca foi utilizado sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays*) que foram plantadas em cinco solos coletados em diferentes pontos no Parque Estadual do Guartelá, sendo 10 repetições de cada tratamento, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi desmontado após 30 dias, para

então fazer o processamento dos nódulos e raízes das plantas para isolamento das bactérias (Medeiros et al., 2009).

3.3. ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS A PARTIR DE NÓDULOS E RAÍZES DE PLANTAS

Para o isolamento de rizóbios a partir de nódulos e raízes de plantas, foi realizada a desinfecção dos mesmos, onde permaneceram por trinta segundos na solução de álcool 70%, em seguida, três minutos na solução de hipoclorito de sódio 3% e por último, foi realizado dez lavagens em água destilada. Para a maceração dos nódulos, os mesmos foram triturados em cadinho pré-estéril, com 100 uL de água destilada, dentro da câmara de fluxo, sendo inoculados em placas de petri, contendo meio sólido seletivo Yeast Mannitol (YMA), com azul de bromotimol, e meio YMA, com vermelho congo, para observação do crescimento dos rizóbios.

Para a maceração de raízes, foi utilizado 8 centímetros de raiz, que foram fragmentadas em pequenos pedaços, para então serem maceradas em cadinho pré-estéril, com 100 uL de água destilada, para onde foram transferidos 100 uL dessa solução para o plaqueamento em triplicata em placas de petri com meio YMA, com azul de bromotimol, e com meio YMA, com vermelho congo. Essas placas foram incubadas em B.O.D, durante 7 dias à 28°C.

As bactérias foram repicadas em placas de petri e incubadas por sete dias a 28°C, para caracterização dessas colônias, quanto ao crescimento, alteração do pH, tamanho, forma, elevação, borda, superfície das colônias, produção de muco, e consistência, cromogênese em meio YMA com corante vermelho congo e com azul de bromotimol, e coloração de Gram.

3.4. AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO INORGÂNICO

Para a seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico *in vitro*, foi utilizada a metodologia Nautiyal (1999), onde as colônias isoladas foram repicadas em quatro pontos distintos da placa de Petri com meio sólido NBRIP (1,0% glicose; 0,5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,5% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02% KCl; 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). O experimento foi incubado durante 15 dias à 28°C. O resultado positivo foi caracterizado pela formação de um halo ao redor das colônias (área clara), verificando quais bactérias solubilizaram o fosfato.

3.5. AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE POTÁSSIO

Para a avaliação da solubilização de potássio, foi utilizado o meio de cultivo Aleksandrov [Glicose 5 g L⁻¹; extrato de levedura 2 g L⁻¹; MgSO_4 0,005 g L⁻¹; FeCl_3 0,08 g L⁻¹; CaCO_3 2 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹; 1,6 g L⁻¹ de K (Fonolito ou KCl), indicador de pH azul de bromotimol 0,025% - 5 mL L⁻¹], ajustando o pH do meio de cultura para 7,0. As placas de petri inoculadas foram incubadas em câmara de crescimento a 25 °C por 10 dias. Foram realizadas as avaliações no 5°, 8° e 10° dia de incubação, verificando quais bactérias solubilizaram o mineral.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias isoladas de raízes de plantas coletadas na Unidade de Conservação do Parque Estadual do Guartelá – PR, apresentaram crescimento rápido (até 3 dias), sendo todas com coloração Gram negativa, e somente o isolado 01 apresentou morfologia de coco, e os demais foram bacilos. A morfologia da colônia mais representativa dentre os isolados avaliados, foi a circular, diferenciando somente o isolado 07, com morfologia irregular. O pH, não alterou nas colônias repicadas em meio de cultura com azul de bromotimol, e as crescidas em meio de cultura com vermelho congo, apresentaram coloração levemente rosadas. A elevação da borda das colônias mais evidenciadas foram as planas e lenticulares, enquanto a borda foi a inteira. As superfícies de todas as colônias foram lisas, a produção de muco não foi muito pronunciada, sendo as consistências mais encontradas, secas e aquosas. Dentre os sete isolados crescidos em meio NBRID, para a solubilização de fosfato, 100% não formaram o halo de solubilização. Quanto ao teste de solubilização de potássio (SK), também nenhum isolado solubilizou esse mineral (Tabela 1).

Tabela 1: Prospecção e caracterização de bactérias isoladas de raízes de plantas do Parque Estadual do Guartelá – PR.

Bactérias isoladas das raízes de plantas Parque Estadual do Guartelá - Paraná												
ID	Cresc (dias)	Gram + ou -	Morf Gram	Morf. Colônia	YMA	Elevação da colônia	Borda da Colônia	Sup. Da Colônia	Produção de muco	Consistência da massa de crescimento	SP	SK
1	rápido	N	coco	circular	L rosado	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
2	rápido	N	bacilo	circular	L rosado	lenticular	inteira	lisa	moderada	aquosa	NS	NS
3	rápido	N	bacilo	circular	L rosado	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
4	rápido	N	bacilo	circular	L rosado	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
6	rápido	N	bacilo	circular	neutro	lenticular	inteira	lisa	pouca	aquosa	NS	NS
7	rápido	N	bacilo	irregular	neutro	lenticular	lobada	lisa	pouca	aquosa	NS	NS
8	rápido	N	bacilo	circular	neutro	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS

ID: identificação das bactérias através de números; Crescimento em dias: rápido, lento ou intermediário, Morfologia Gram: coco, bacilo, cocobacilo, levedura; Morfologia da colônia: circular, irregular, puntiforme ou filamentosa; YMA: meio de cultura com o corante azul de bromotimol: ácido (amarelo), neutro (sem alteração de cor), alcalino (azul); YMA: meio de cultura com o corante vermelho congo: incolor (lupa), branco, levemente rosado, rosa (bebê), avermelhado (centro), vermelho. Elevação da colônia: plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada; Borda da colônia: inteira, ondulada, lobada, denteada ou filamentosa; Superfície da colônia: Lisa, rugosa ou papilada; Produção de muco: escassa, pouca, moderada ou abundante; Consistência da massa de crescimento: seca, aquosa, gomosa (creme), viscosa (elástica), butírica (manteiga); SP (Solubilização de fosfato): NS: não solubiliza fosfato; SP: solubiliza fosfato; SK (Solubilização de Potássio): NS: não solubiliza potássio; SK: solubiliza potássio.

As bactérias isoladas de nódulos e raízes de plantas-iscas (feijão e milho) cultivadas em solos coletados da Unidade de Conservação do Parque Estadual do Guartelá – PR, apresentaram crescimento rápido (até 3 dias), sendo que somente os isolados 09, 10, 11 e 23 apresentaram coloração Gram positiva e os demais, Gram negativos. A maioria possui forma de bacilo, sendo o isolado 19 e 21 Cocobacilos e o 23 uma levedura. A morfologia das colônias mais representativa foi a circular. O pH, nas colônias repicadas em meio de cultura com azul de bromotimol, foi ácido no isolado 10 (coloração amarela) e alcalina nos isolados 12 e 17 e as demais não alteraram o pH (coloração verde). A elevação da borda das colônias mais evidenciadas foram as planas, lenticulares e convexas, enquanto, a borda foi a inteira. As superfícies de todas as colônias foram lisas,

a produção de muco não foi muito pronunciada, sendo as consistências mais encontradas, secas e aquosas. Dentre os quinze isolados crescidos em meio NBRID, para a solubilização de fosfato, 86,7% não formaram o halo de solubilização, sendo somente os isolados 19 e 20, que apresentaram essa capacidade. Quanto ao teste de solubilização de potássio (SK), 93,4% não solubilizaram, sendo somente o isolado 14, que apresentou a capacidade de solubilizar potássio (Tabela 2).

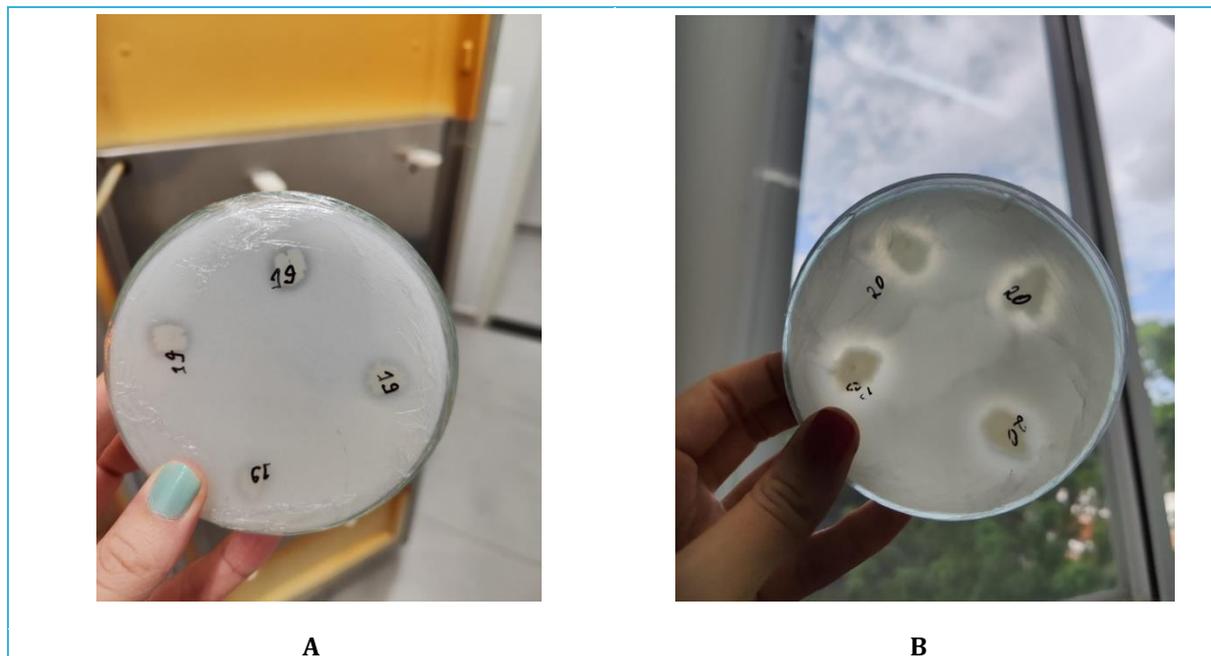
Tabela 2: Prospecção e caracterização de bactérias isoladas de nódulos e raízes de plantas-iscas (feijão e milho), isoladas em solos do Parque Estadual do Guartelá – PR.

Bactérias isoladas de planta-isca feijão (nódulos) milho (raízes) do solo do Parque Estadual do Guartelá - Paraná												
ID.	Cresc (dias)	Gram + ou -	Morf Gram	Morf. Colônia	YMA	Elevação da colônia	Borda da Colônia	Sup. Da Colônia	Produção de muco	Consistência da massa de crescimento	SP	SK
9	rápido	P	bacilo	circular	neutro	lenticular	inteira	lisa	pouca	aquosa	NS	NS
10	rápido	P	bacilo	circular	ácido	lenticular	inteira	lisa	moderada	gomosa	NS	NS
11	rápido	P	bacilo	circular	neutro	plana	inteira	lisa	pouca	aquosa	NS	NS
12	rápido	N	bacilo	circular	alcalino	plana	inteira	lisa	pouca	aquosa	NS	NS
13	rápido	N	bacilo	circular	neutro	lenticular	inteira	lisa	pouca	gomosa	NS	NS
14	rápido	N	bacilo	circular	neutro	convexa	inteira	lisa	moderada	aquosa	NS	SK
15	rápido	N	bacilo	circular	neutro	lenticular	inteira	lisa	moderada	aquosa	NS	NS
16	rápido	N	bacilo	circular	neutro	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
17	rápido	N	bacilo	circular	alcalino	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
18	rápido	N	bacilo	circular	neutro	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
19	rápido	N	cocobacilo	circular	neutro	plana	inteira	lisa	escassa	seca	SP	NS
20	rápido	N	bacilo	circular	neutro	lenticular	inteira	lisa	moderada	gomosa	SP	NS
21	rápido	N	cocobacilo	circular	neutro	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
22	rápido	N	bacilo	circular	neutro	plana	inteira	lisa	escassa	seca	NS	NS
23	rápido	P	levedura	circular	neutro	convexa	inteira	lisa	moderada	viscosa	NS	NS

ID: identificação das bactérias através de números; Crescimento em dias: Rápido, lento ou intermediário, Morfologia gram: coco, bacilo, cocobacilo, levedura; Morfologia da colônia: circular, irregular, puntiforme ou filamentosa; YMA: meio de cultura com o corante azul de bromotimol: ácido (amarelo), neutro (sem alteração de cor), alcalino (azul); YMA: meio de cultura com o corante vermelho congo: incolor (lupa), branco, Levemente rosado, rosa (bebê), avermelhado (centro), vermelho. Elevação da colônia: plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada; Borda da colônia: inteira, ondulada, lobada, denteada ou filamentosa; Superfície da colônia: Lisa, rugosa ou papilada; Produção de muco: escassa, pouca, moderada ou abundante; Consistência da massa de crescimento: seca, aquosa, gomosa (creme), viscosa (elástica), butírica (manteiga); SP (Solubilização de fosfato): NS: não solubiliza fosfato; SP: solubiliza fosfato; SK (Solubilização de Potássio): NS: não solubiliza potássio; SK: solubiliza potássio.

Bactérias que solubilizam fosfato, apresentam a capacidade de converter o fósforo insolúvel presente no solo, em uma forma disponível para as plantas (Figura 1). Em outros estudos, já foram relatados que bactérias pertencentes a estes gêneros: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Exiguobacterium*, *Natrinema*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia*, são eficientes solubilizadores de fósforo (Garcia et al., 2015; Kour et al., 2021).

Figura 1: Bactérias isoladas em meio NBRIP para solubilização de fosfato. Isolados 19 (A) e 20 (B), formaram o halo de solubilização



Bactérias que solubilizam potássio, tem a capacidade de solubilizar esse composto que está retido em minerais silicáticos, através da decomposição, e assim disponibilizam o potássio que está indisponível no solo para a planta (Figura 2). Dentre os principais grupos de solubilizadores de potássio, podemos citar: *Acidothiobacillus ferrooxidans*, *Paenibacillus spp*, *Bacillus mucilaginosus*, *B. Edaphicus*, *B. Circulans*, *Arthrobacter sp*, *Enterobacter hormaechei*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *P. Frequentans*, *Cladosporium sp*, *Aminobacter sp*, *Sphingomonas sp*, *Burkholderia sp* e *Paenibacillus gluconolyticus* (Meena; Maurya; Bahadur, 2014).

Figura 2: Bactérias isoladas em meio aleksandrov para solubilização de potássio. Isolado 14, formou o halo de solubilização



A investigação conduzida por Oliveira et al. (2020) também destaca o potencial de solubilização de fosfato e potássio por parte de bactérias diazotróficas, contudo, é relevante notar que este estudo foi realizado em meio líquido, diferenciando-se da abordagem adotada neste trabalho, que foi conduzido em meio sólido. No presente estudo, foram identificados 10 isolados com capacidade de solubilização de fosfato (P) e seis com capacidade de solubilização de potássio (K), dentre um total de 12 bactérias diazotróficas isoladas. Contrastando com isso, no estudo de Massensini et al. (2016), foram isoladas 24 bactérias da rizosfera de *Eucalyptus* sp., todas as quais apresentaram habilidade para solubilizar fosfato.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, as bactérias isoladas das raízes de plantas coletadas na Unidade de Conservação do Parque Estadual do Guartelá - PR apresentaram um crescimento rápido em até 3 dias, todas exibindo coloração Gram negativa, exceto o isolado 01, que apresentou morfologia de coco, enquanto os demais foram bacilos. A morfologia da colônia mais representativa foi circular, com exceção do isolado 07, que exibiu uma morfologia irregular. As características das colônias, incluindo pH, elevação, borda, superfície e consistência, variaram entre os isolados. No entanto, nenhum dos sete isolados testados em meio NBRID para solubilização de fosfato formou halo de solubilização, e nenhum deles solubilizou potássio.

Os isolados bacterianos que apresentaram maior capacidade de serem promotores de crescimento vegetal, foram isolados de plantas-iscas (feijão e milho), sendo o isolado 19 e 20 solubilizador de fosfato e o isolado 14 solubilizador de potássio. Com a descrição dessas bactérias, é possível utilizar essas informações, para posteriormente fazer o sequenciamento do 16 S, e conseguir identificar de qual gênero e espécie essas bactérias pertencem. Além disso, o teste de solubilização de potássio e fosfato, indicam um potencial dessas bactérias serem promotoras de crescimento de plantas. Por isso, é necessário mais estudo, para realizar outros testes que indiquem esse potencial, para em seguida, testar a inoculação dessas bactérias em plantas.

Sendo assim, capacidade de algumas bactérias isoladas de solubilizar fosfato destaca seu potencial em converter fósforo insolúvel em formas disponíveis para as plantas, sendo esse fenômeno documentado em diversos gêneros bacterianos. As bactérias solubilizadoras de potássio, por sua vez, desempenham um papel crucial na disponibilização desse nutriente para as plantas, decompondo minerais silicatados.

Os resultados obtidos fornecem insights valiosos sobre a diversidade funcional dessas comunidades bacterianas na Unidade de Conservação do Parque Estadual do Guartelá - PR.

REFERÊNCIAS

- [1] BOSWELL, F. C.; MEISINGER, J. J.; CASE, N. L. Produção, comercialização e uso de fertilizantes nitrogenados. **Soil Science Society of America**, p. 229-292, 1985.
- [2] CATTELAN, A. J. (1999) Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Embrapa Soja, Londrina, PR, 36p. (Documentos, 139).
- [3] DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p. 107- 149, 2003.

- [4] FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.
- [5] GARCIA, R.A.; LOVAISA, N.C.; ULLA, E. L. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria in northwestern Argentina and its effect in promoting growth in maize (*Zea mays* L.). **Revista Agronomia Noroeste Argentina** v.35, p.13-28, 2015.
- [6] GRZEBISZ, W.; GRANSEE, A.; SZCZEPANIAK, W.; DIATTA, J. The effects of potassium fertilization on water-use efficiency in crop plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 3, p. 355-374, 2013.
- [7] HAMID, F.; YAZDANPANA, M.; BARADARAN, M.; KHALILIMOGHADAM, B. E.; AZADI, H. Fatores que afetam o comportamento dos agricultores no uso de fertilizantes nitrogenados: sociedade versus avaliação dos agricultores no sudoeste do Irã. **Jornal de Planejamento e Gestão Ambiental**, v.64, n.10, p.1886-1908, 2021.
- [8] HEDRICH, R. Ion channels in plants. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 1777-1811, 2012.
- [9] HUNGRIA, M.; SILVA, K. D. A. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.
- [10] IKEDA, A. C. et al. Bioprospecting of elite plant growth-promoting bacteria for the maize crop. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.42, n.1, p.44364, 2020.
- [11] KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L.A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian Cacti Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Under Drought. **Microbiological Research**, 2012.
- [12] KLEIN, R.M. & HATSCHBACH, G. 1971. Fitofisionomia e notas complementares sobre o mapa fitogeográfico de Quero-Quero (Paraná). Boletim Paranaense de Geociências 28-29: 159-188.
- [13] KOUR, D. et al. Microbial biofertilizers: bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.23, p.101-487, 2020.
- [14] KOUR, D.; RANA, K.L.; KAUR, T.; YADAV, N.; YADAV, A.N.; KUMAR, M.; KUMAR, V.; DHALIWAL, H.S.; SAXENA, A.K. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: A review. **Pedosphere**, v.31, p.43-75, 2021.
- [15] LEITE, R. D. C. et al. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop & Pasture Science**, v.70, n.1, p.61-67, 2019.
- [16] LIN, Y. et al. Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on corn growth under different fertility sources. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.49, n.10, p.1239-1255, 2018.
- [17] LIU, B.; WANG, X.; MA, L.; CHADWICK, D. E.; CHEN, X. Aplicações combinadas de fertilizantes nitrogenados orgânicos e sintéticos para melhorar o rendimento das culturas e reduzir as perdas reativas de nitrogênio dos sistemas vegetais da China: uma metanálise. **Poluição Ambiental**, v.269, p.116-143, 2021.
- [18] LONGHINI, V. Z. et al. Inoculation of diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization in topdressing in irrigated corn. **Revista Caatinga**, v.29, n.2, p.338-347, 2016.
- [19] LYNCH, J. M & WHIPPS, J. M. Fluxo de substrato na rizosfera. **Solo vegetal**, v.129, p.1-10, 1990.
- [20] LYU, Y. et al. Major crop species show differential balance between root morphological and physiological responses to variable phosphorus supply. **Frontiers of Plant Science**, v.7, p.1939-1939, 2016.
- [21] MAHMUD, K. et al. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. **Plants, Switzerland**, v.9, n.1, 2020.
- [22] MASSENSINI, A. M.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A. C.; COSTA, M. D. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from *Eucalyptus* sp. Rhizosphere. **Revista Árvore**, v.40, p.125-134, 2016.
- [23] MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; BAHADUR, I. Solubilização de potássio por cepa bacteriana em resíduos mica. **Bang Journal Botanical**. v.43, p.235-237, 2014.

- [24] MEDEIROS, E. V. et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.
- [25] MOLAJOU, A.; AFSHAR, A.; KHOSRAVI, M.; SOLEIMANIAN, E.; VAHABZADEH, M.; VARIANI, H. Á. Um novo paradigma de água, alimentos e nexo energético. **Ciência Ambiental e Pesquisa Internacional sobre Poluição**, 2021.
- [26] MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (2006) Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras, MG, Editora UFLA. 729p.
- [27] MORETTI, L. G. et al. Effects of growth-promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield. **Agronomy Journal**, v.112, n.1, p.418-428, 2020.
- [28] NARAYANASAMY, S.; THANGAPPAN, S.; UTHANDI, S. Plant growth-promoting *Bacillus* sp. cahoots moisture stress alleviation in rice genotypes by triggering antioxidant defense system. **Microbiological Research**, v. 239, p. 126518, 2020.
- [29] NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265- 270, 1999.
- [30] NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. **Universidade Federal de Viçosa**, p.399, 1999.
- [31] OLIVEIRA, A. J.; FRANCO, T. C.; FLORENTINO, L.A.; LANDGRAF, P. R. C. Characterization of associative diazotrophic bacteria in torch ginger. **Semina: Ciências Agrárias**, v.41, p.2815-2824, 2020.
- [32] OLIVEIRA, A. P. Rendimento produtivo e econômico do feijão-caupi em função de doses de potássio. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.629-634, 2009.
- [33] PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, É. L.; CARARETO-ALVES, L. M. LEMOS, E. G. M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1921-1927, 2008.
- [34] PEREIRA, W. et al. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria. **Sugar Tech**, v.21, n.1, p.71-82, 2019.
- [35] PRAJAPATI, K.; MODI, H. A. The importance of potassium in plant growth: a review. **Indian Journal of Plant Sciences**, v.1, n.1/2, p.177-186, 2012.
- [36] PUENTE, M. L. et al. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. **Symbiosis**, v.76, n.1, p.41-49, 2018.
- [37] PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. In vitro and in vivo analyses of plant-growth-promoting potential of bacteria naturally associated with spruce trees growing on nutrient-poor soils. **Applied Soil Ecology**, v.149, p.103-538, 2020.
- [38] RAJAPAKSHA, R. M. C. P.; HERATH, D.; SENANAYAKE, A. P.; SENEVIRATHNE, M. G. T. L. Mobilization of rock phosphate phosphorus through bacterial inoculants to enhance growth and yield of wetland rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.42, p.301-314, 2011.
- [39] ROCHA, C. H. 1995. Ecologia da paisagem e manejo sustentável em bacias hidrográficas: estudos do Rio São Jorge nos Campos Gerais do Paraná. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- [40] RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n.4-5, p.319-339, 1999.
- [41] SILVEIRA, A. P. D. et al. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. Antonie van Leeuwenhoek. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.112, n.2, p.283-295, 2019.
- [42] SOUCHIE, E. L.; ÁZCON, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1149-1152, 2005.
- [43] SOUZA, E. M. et al. Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield? **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.23, n.1, p.53-59, 2019.

- [44] TORRES, M. et al. Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. **Applied Soil Ecology**, v.150, p.103-453, 2020.
- [45] VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p.
- [46] WANG, N. et al. Genotypic variation in photosynthetic and physiological adjustment to potassium deficiency in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.110, p.1-8, 2012.
- [47] YAO, Z. et al. Benefícios agronômicos, ambientais e ecossistêmicos do nitrogênio de liberação controlada fertilizantes para a produção de milho no sudoeste da China. **Journal of Cleaner Production**, v.312, p.127-611, 2021.
- [48] ZAHEER, M. S. et al. Investigating the effect of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium pisi* on agronomic traits of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.65, n.11, p.1-11, 2019.
- [49] ZAREI, T. et al. Improving sweet corn (*Zea mays* L. var *saccharata*) growth and yield using *Pseudomonas fluorescens* inoculation under varied watering regimes. **Agricultural Water Management**, v.226, p.105-757, 2019.
- [50] ZÖRB, C.; SENBAYRAM, M.; PEITER, E. Potassium in agriculture: status and perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 9, p. 656-669, 2014.

www.poisson.com.br
contato@poisson.com.br

@editorapoisson



<https://www.facebook.com/editorapoisson>

