



Indicadores fitoquímicos e atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides* ("macela") frente *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos isoladas em produtos de origem animal (suínos e aves)¹

*Phytochemical indicators and antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* ("macela") against antibiotic-resistant *Salmonella* spp. isolated from animal products (swine and poultry)*

**Mônica Jachetti Maciel², Magnólia Aparecida Silva da Silva³, Eduardo Ethur⁴,
*César Augusto Marchionatti Avancin⁵**

Resumo: A resistência aos antibióticos, desinfetantes e antissépticos motivam a busca por novos antimicrobianos, tendo-se nas extrações vegetais um potencial bioativo. Os objetivos do trabalho foram testar o extrato hidroalcoólico bruto de *A. satureioides* frente 51 cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos isoladas em matéria-prima animal, e detectar compostos fitoquímicos na solução. Foi preparada maceração na proporção 5 g das inflorescências secas : 100 mL de etanol em 70° GL, e após 15 dias o álcool foi removido com evaporador rotativo. Reconstituído o volume inicial com água destilada estéril, resultou em extrato bruto na concentração de 50 mg/mL. Foi usado o teste quantitativo europeu de suspensão, confrontando os inóculos nas densidades populacionais (DP) de 10⁷, 10⁶ e 10⁵ UFC/mL, em tempos de contato 5, 15, 60 minutos e de hora em hora até 10 horas. Na DP 10⁷, as 5 h de contato 35% e as 10 h 100% dos isolados estavam inativados; na DP 10⁶ as 5h 39% e as 9 h 100% estavam inativados; na DP 10⁵ as 5 h 51% e as 9 h 100% estavam inativados. Concluiu-se que o extrato bruto inativou todas as cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos, e que o tempo de contato necessário para a atividade bactericida esteve relacionada com a DP inicial da suspensão e com características intrínsecas dos isolados. A detecção fitoquímica identificou compostos fenólicos como os taninos hidrolisáveis e condensados, flavonóis e saponinas.

Palavras-chave: antimicrobiano vegetal; extrato vegetal; compostos fenólicos.

Abstract: Resistance to antibiotics, disinfectants and antiseptics motivates the search for new antimicrobials, having in plant extracts a bioactive potential. The objectives of the study were to test the crude hydroalcoholic extract of *A. satureioides*, against 51 strains of *Salmonella* spp. resistant to antibiotics isolated from animal raw material, and to detect the phytochemical compounds in the solution. Maceration was prepared in the proportion of 5g of the dried inflorescences: 100 mL of ethanol at 70°GL, and after 15 days the alcohol was removed with rotary evaporator. Reconstituting the initial volume with sterile distilled water resulted in the crude extract at a concentration of 50 mg/mL. The European quantitative suspension test was used, comparing the inocula in the population densities (PD) of 10⁷, 10⁶ and 10⁵ CFU/mL, in contact times of 5, 15, 60 minutes, and hourly, up to 10 hours. In the PD 10⁷, in 5 h of contact 35%, and in 10h 100% of the isolates were inactivated; in PD 10⁶, in 5 h of contact 39% and in 9h 100% were inactivated; in the PD 10⁵, in 5 h 51% and in 9h 100% were inactivated. It was concluded that the crude extract inactivated all strains of *Salmonella* spp. resistant to antibiotics, and that the contact time required for the bactericidal activity was related to the initial PD of the suspension and with the intrinsic characteristics of the isolates. The phytochemical detection identified phenolic compounds such as hydrolysable and condensed tannins, flavonols, and saponins.

Key-words: vegetable antimicrobial; vegetable extract; phenolic compounds.

Autor para correspondência: E.Mail: cesar.avancini@ufrgs.br

Recebido em 12.01.2017. Aceito 30.09.2017

* Doutor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - E-mail: cesar.avancini@ufrgs.br

¹ Extraído de tese para doutoramento.

² Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS. E-mail: moni.jm@hotmail.com

³ Doutora, Faculdade de Agronomia, Departamento de Horticultura e Fruticultura, - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS. E-mail: magnolia.silva@ufrgs.br

⁴ Doutor, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Unidade Integrada Vale do Taquari de Ensino Superior (UNIVATES), Lageado/RS, Brasil. E-mail: eduardome@univates.br

⁵ Doutor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Av. Bento Gonçalves, n.9.090, Bairro Agronomia, Porto Alegre/RS, CEP 91540-000.. E-mail: cesar.avancini@ufrgs.br - Tel (51) 33086123.

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20170028>

Introdução

As bactérias do gênero *Salmonella* estão distribuídas na natureza e em ambientes antropogênicos, constituindo-se como potencial problema tanto para a saúde animal quanto para a saúde humana (SCHWARTZ, 2000). A salmonelose é considerada uma das principais zoonoses, sendo que a transmissão geralmente acontece através do consumo de alimentos de origem animal contaminados (ACHA e SZYFRES, 2001; SHINOHARA et al., 2008; MADIGAN et al., 2011).

A utilização generalizada, ou pouco criteriosa, dos antibióticos para fins terapêuticos, para fins profiláticos e como promotores de crescimento animal tem intensificado o risco para o surgimento de micro-organismos resistentes. Isso se torna mais preocupante pelo fato de que as classes de antibióticos utilizados nos animais são igualmente utilizadas para humanos (WHO, 2007).

Limitações no uso dos antimicrobianos convencionais podem ocorrer devido à resistência, seja intrínseca ou adquirida (CHAPMANN, 1998; EUROPEAN COMMISSION, 2009) dos micro-organismos, o que motiva a busca de novos compostos para combatê-los. Essa busca é também incentivada para uso nos sistemas tecnológicos de criação animal referenciados nos modelos orgânico/agroecológico, que demandam insumos/recursos sanitários veterinários considerados sustentáveis (Brasil, 2011), renováveis, para que sejam usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais (OMS, 2002; CAMPOS et al., 2013). A utilização de extratos vegetais brutos facilitariam o acesso de higienistas-sanitaristas a esses recursos.

O Brasil é um país com grande biodiversidade que associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um

valioso conhecimento tradicional e popular associado ao uso de plantas medicinais, possuindo o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Para estimular a investigação científica, o Estado brasileiro editou o Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, que trata da criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006).

Com esse sentido, o estudo da atividade de extrações vegetais vem se desenvolvendo como nos trabalhos para avaliar a bioatividade de *Achyrocline satureioides* ("macela"). Essa é uma planta nativa no sul do Brasil (LORENZI e MATOS, 2008), popular e tradicionalmente considerada medicinal. Investigações científicas relatam sua ação anti-inflamatória, antiespasmódica, analgésica e sedativa. (SIMÕES et al., 1989). Estudos mostraram que o potencial de cito e genotoxicidade de extrações da planta varia com a concentração de uso (RIVERA et al., 2004; FACHINETTO et al., 2007; SABINI et al., 2013; SALGUEIRO et al., 2016). Revisão de literatura científica sobre ela pode ser encontrada em Barata et al. (2009) e RETTA et al. (2012).

Especificamente sobre a atividade

antimicrobiana de *A. satureioides* frente diversas bactérias Gram-positivas padrões (*Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) são relatadas como apresentando significativa intensidade por Simões (1984), Perez e Anesi (1994), Fernandes et al. (2003), Silva et al. (2004), Gravino et al. (2005), Fish et al (2005), Avancini e Wiest, (2008), Wiest et al. (2009), Mota et al. (2011) e JORAY et al. (2011). Frente bactérias isoladas em situações-problema sanitários tem-se em Lemos et al (2000) com *Staphylococcus aureus* isolados em mastite subclínica, Sperotto et al. (2012) frente *Staphylococcus* spp, e *Streptococcus* spp. isolados em mastites clínicas e por Both et al. (2016) confrontando *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Frente bactérias Gram-negativas Sperotto et al. (2012) sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em mastite. Frente *Candida* padrão e isoladas em leite de vacas com mastite o relato de CAMPOS et al. (2016).

Relatos de confronto com extrações da planta especificamente frente salmonelas foram encontrados em Perez e Anesini (1994), Silva et al. (2004) e Avancini e Wiest (2008), Mota et al. (2011), Voss-Rech et al. (2011) e JORAY

et al. (2011).

Este trabalho teve como objetivos testar o extrato hidroalcoólico bruto de *A. saturoioides* frente *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos isoladas em alimentos de origem animal, bem como detectar a presença de indicadores fitoquímicos.

Material e Método

Extrato bruto

A *Achyrocline saturoioides* (Lam.) DC. - Asteracea (“macela”) foi adquirida de um único fornecedor, na Feira de Agricultores Ecologistas em Porto Alegre/RS/BR, e obtida por cultivo em sistema de permacultura no Sítio Aquarius, na região de Gramado/RS/BR. Foi identificada botanicamente e exsicata depositada no acervo do Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob número ICN 176251.

Tendo referência a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1959), para a obtenção do extrato vegetal foi elaborado macerado hidroalcoólico. As inflorescências secas de *A. saturoioides* foram colocadas em frasco de vidro com álcool etílico de cereais (Farmaquímica®) na densidade 70°GL, na proporção (p : v) de 5 g : 100 mL. Este frasco foi mantido no escuro e agitado uma vez ao dia por um período de quinze dias. O álcool foi retirado com aparelho evaporador rotativo

(FISATON® 802D), na temperatura de 60°C. Desprezada a porção alcoólica, a solução foi reconstituída ao volume inicial com água destilada estéril, constituindo uma solução de 50 mg/mL.

Sempre ao início dos testes, o controle de esterilidade do extrato era realizado por meio do plaqueamento de 0,1 mL em ágar BHI (ágar BHI- Himedia®). O extrato era espalhado na superfície com alça de Drigalski, e em seguida as placas incubadas a 36 °C (+/- 1°C) por 24 horas.

Micro-organismos

Foram usadas 51 *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos. Destas, 39 eram resistentes a amoxicilina, 39 a tetraciclina, 35 a ampicilina, 23 a gentamicina, 18 a ceftiofur, 6 a florfenicol, 6 a sulfatrimetoprim e 3 a enrofloxacin. Das 51 salmonelas, 35% (18) eram resistentes a um composto antibiótico, 10% (5) a dois, 18% (9) a três, 33% (17) a quatro, 2% (1) a cinco e 2% (1) a seis grupos de antibióticos.

As cepas estavam congeladas (-10 °C) em criotubos contendo caldo de infusão cérebro e coração (caldo BHI- Himedia®) e glicerol (Synth®), e foram isoladas entre 2010 e 2011 na rotina de um laboratório de microbiologia de referência (credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), na região do Vale do Taquari/RS/BR. A origem dos isolados

foram matéria-prima e produtos de origem avícola e suínica com apresentação *in natura*, resfriados ou congelados, como: carcaças suína e de frango, carne mecanicamente separada de ave, farinha de pena e vísceras, ovos, linguiça toscana, miúdo suíno, banha de porco e queijo suíno.

Para a reativação, uma pequena quantia foi retirada dos criotubos por meio de alça bacteriológica e semeada em caldo BHI incubado a 36 °C (+/- 1°C) por 24 horas. Após esse período uma pequena quantia ("alçada") foi inoculada, por meio de esgotamento, para o ágar de infusão cérebro e coração (ágar BHI- Himedia®) e para o ágar xilose lisina desoxicolato (ágar XLD -Oxoid®) e incubada a 36°C (+/- 1°C) por 24 horas.

A densidade populacional (DP) inicial dos inóculos foi padronizada utilizando-se controle de turbidez equivalente a solução padrão McFarland de 0,5 (equivalente a uma suspensão contendo 10⁸ UFC/mL). As densidades populacionais de confronto com o extrato foram de 10⁷, 10⁶ e 10⁵ UFC/mL.

Nos testes de sensibilidade a antibióticos a leitura dos resultados é realizada no tempo de contato de 24 horas. No entanto, objetivando observar o tempo de contato necessário para que o extrato promova a redução logarítmica, ou a inativação total da suspensão bacteriana,

realizou-se a leitura dos resultados nos tempos de contato de 5, 15, 60 minutos e de hora em hora até 10 horas (tempo final definido em testes piloto).

Como referência, ou controle, da intensidade da atividade do extrato bruto usou-se as cepas padrões *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 10.708) e *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13.076).

Teste de avaliação da atividade bactericida

Foi utilizado o teste europeu de suspensão quantitativo que avalia a atividade bactericida de desinfetantes e antissépticos químicos, conforme o protocolo do Comitê Europeu de Padronização (BRITISH STANDARD, 2006).

O teste consiste em suspender um mL do inóculo em tubos de ensaio contendo 9 mL (uma para cada densidade populacional e tempos de contato pré-definidos) do extrato vegetal. Após os tempos de contato, um mL era inoculado em tubo de ensaio com 9 mL de caldo BHI com neutralizador (3% de polissorbato 80 (Sinth®), 0,3% de lecitina de soja (Delaware®) e 0,1% de histidina (Sinth®), onde permanecia por cinco minutos. Em seguida, diluição logarítmica seriada era feita passando um mL de cada tubo de ensaio com neutralizador (por tempo de contato e densidade populacional) para tubo com 9 mL de peptona salina. De cada

uma dessas diluições eram plaqueados 0,1 mL em ágar BHI e em ágar XLD e o inóculo espalhado na superfície com o auxílio de alça de Drigalski. As placas eram incubadas a 36°C (+/- 1°C) por 24 horas.

Na leitura das placas era verificado se havia crescimento bacteriano, e em havendo realizava-se a contagem definida como o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) viáveis.

Deteção fitoquímica

Utilizou-se o extrato vegetal de *A. satureioides* do mesmo modo que elaborado para o teste de suspensão. A deteção foi realizada a partir de adaptações de Harborne (1998), Farmacopéia Brasileira (1988) e Falkenberg et al. (2003), tendo como referência grupos e compostos químicos já identificados na planta. Foi investigada a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonóides, cumarinas, quinonas, saponinas e alcalóides.

Análise estatística

Seguiu-se a apresentação descritiva dos dados, mostrados na forma de frequência absoluta e frequência relativa.

Resultados e Discussão

Para que os resultados da ação bactericida sobre os micro-organismos confrontados fossem confiáveis, utilizou-se o caldo BHI com neutralizador. A utilização de neutralizadores objetiva

evitar observações falsas negativas, ou seja, a ação bacteriostática de um composto antimicrobiano sendo confundida com a ação bactericida (neste caso, da extração vegetal). Os neutralizantes atuam inativando os resíduos da substância antimicrobiana, após o contato com o inóculo microbiano. Como os neutralizadores não são padronizados para o uso específico de *A. satureioides*, manteve-se aqueles indicados no protocolo do teste usado neste trabalho, e que correspondem aos utilizados também nos estudos de Mota et al. (2011), Sperotto et al. (2012) e por BOTH et al. (2016).

O motivo da escolha para uso da técnica europeia de suspensão deveu-se ao fato de que se pode observar os resultados de forma quantitativa, permitindo verificar e acompanhar a atividade de redução logarítmica ou de inativação da densidade populacional inicial ao longo de determinado tempo de contato da solução antimicrobiana, fornecendo mais informação do que as técnicas qualitativas dicotômicas tipo positivo/ negativo, ou cresceu/não cresceu.

O extrato inativou a duas cepas padrões. Houve alguma diferença entre elas quanto ao tempo de contato necessário para que a ação bactericida ocorresse, necessitando maior tempo para *Salmonella* Enteritidis do que para a *Salmonella* Choleraesuis, discriminando-se o resultado

do seguinte modo: a) *Salmonella* Choleraesuis (ATCC 10.708), na DP 10^7 , na leitura de uma hora de contato restaram apenas 4 UFC viáveis e as 4 horas de contato a suspensão bacteriana estava inativada; na DP 10^6 , já estava inativada na leitura de uma hora de contato, o mesmo ocorrendo na DP 10^5 UFC/mL. b) *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13.076), na DP 10^7 , na leitura de 4 horas de contato restavam três UFC viáveis, e as 5 horas a suspensão estava inativada; na DP 10^6 as na leitura das duas horas de contato restava uma única UFC viável, estando inativada na leitura das 4 horas; na DP 10^5 UFC/mL nas duas horas de contato restava uma UFC, que estava inativada na leitura seguinte, das 3 horas de contato.

Aferindo os resultados obtidos frente as salmonelas padrões com os de outros pesquisadores, com dificuldade de comparação quando usando outras formas farmacêuticas, Perez e Anesini (1994) com método de difusão em poços em ágar previamente cultivado com *Salmonella typhi* isolada de caso clínico, inocularam extrato aquoso com concentração de 62,5 mg/mL de *Achyrocline* sp e observaram halo de inibição de 12,1 mm, estando entre os 24 extratos que apresentaram atividade frente a bactéria, dos 108 testados.

Silva et al. (2004), usado o decocto (extrato aquoso) da planta na proporção 5 g das inflorescência : 100 mL, informaram a

atividade sobre baixa densidade populacional de *Salmonella* Choleraesuis. Avancini e Wiest (2008) observaram que o extrato hidroetílico, na mesma proporção usada, inativou essa cepa padrão, porém em densidades populacionais mais baixas que as confrontadas neste trabalho.

Mota et al. (2011), também pela técnica de suspensão, porém em sistema de tubos múltiplos, confrontaram o decocto e a hidroalcoolatura (extrato bruto) frente nove diluições logarítmicas seriadas de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076). Observaram que o decocto não apresentou atividade sobre a cepa, mas que o extrato hidroalcolóico promoveu sua inativação. Voss-Rech et al. (2011), usando a técnica de microdiluição observaram unicamente ação bacteriostática do extrato hiroetanólico frente a 61% dos 20 sorovares de salmonelas confrontados, mas Joray et al. (2011) demonstraram que o extrato hidroetanólico da planta promove a inativação de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em concentração de 2 mg/mL

Para explicar o fato de que ocorrem resultados nem sempre padronizados quando do confronto de extrações de plantas sobre os mesmos microrganismos, além do uso de solventes com polaridades diferentes, diferentes métodos e técnicas de extração fitoquímica e diferentes métodos e técnicas de avaliação da atividade, pode-se assumir que algumas diferenças de

atividade biológica possam ocorrer em plantas do mesmo gênero e espécie porque os metabólitos secundários podem sofrer variações devido condições temporais sazonalidade e mesmo diário, período de coleta, características climáticas e ambiente geográfico, como já apontado por DARROW & BOWERS (1997).

Na Tabela 1 estão as frequências absolutas dos isolados de *Salmonella* spp. relacionadas às reduções logarítmicas ou de inativação pelo extrato hidroalcoólico

bruto, em diferentes densidades populacionais e tempos de contato.

O extrato inativou todas as cepas resistentes a antibióticos isoladas em produtos de origem animal (suínos e aves) tendo-se observado que, assim como ocorreu com as cepas padrões, o tempo de contato para que a ação bactericida ocorresse esteve relacionado com a densidade populacional inicial da suspensão: quanto maior a densidade populacional, maior o tempo de contato necessário para a ação.

Tabela 1- Frequência absoluta de isolados de *Salmonella* spp. (N=51) resistentes a antibióticos em relação a redução logarítmica e a inativação quando confrontados com o extrato hidroalcoólico bruto das inflorescências de *A. saturoioides*, na proporção de 5 g : 100 mL (50 mg/mL), em condições de diferentes densidades populacionais e tempos de contato.

DP	RL	5min	15min	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
10⁷ UFC/mL	SR	51	51	50	44	40	39	22	14	3	1	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	4	3	4	3	7	8	5	2	0
	3	0	0	1	0	2	1	5	2	4	3	1	0
	4	0	0	0	0	0	2	3	1	3	1	2	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
IN	0	0	0	3	6	5	18	27	33	40	46	51	
10⁶ UFC/mL	SR	48	47	43	34	32	26	2	1	1	0	0	0
	1	3	4	5	4	8	13	14	6	0	0	0	0
	2	0	0	2	4	2	4	7	10	6	1	0	0
	3	0	0	1	1	3	2	8	6	6	2	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IN	0	0	0	4	6	6	20	28	38	48	51	51
10⁵ UFC/mL	SR	48	45	40	36	26	23	1	1	0	0	0	0
	1	3	6	7	8	13	13	15	2	1	0	0	0
	2	0	0	2	2	3	4	9	15	5	1	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IN	0	0	2	5	9	11	26	32	45	50	51	51

DP: densidade populacional inicial do inóculo; RL: redução logarítmica; SR: sem redução; IN: inativação total do inóculo.

Sobre esse fenômeno, qual seja, a relação da densidade populacional e a

curva de morte microbiana por tempo de contato já foi descrito e pode ser visto, por

exemplo, em TORTORA et al. (2012). A finalidade em confrontar o extrato com diferentes densidades populacionais teve por motivação simular diferentes situações-problemas sanitários, quando o número de micro-organismos presentes pode variar quanto a densidade populacional, mas que esse fato interfere no tempo necessário para obtenção da eficácia (benefício esperado/benefício obtido) dos procedimentos sejam terapêuticos ou os para o controle dos micro-organismos no ambiente.

Na densidade populacional do inóculo em 10^7 UFC/mL a redução logarítmica iniciou a partir da 1 hora, porém em apenas um isolado, e a inativação as duas horas, em três isolados. A redução logarítmica e a inativação começou ocorrer com maior intensidade as 5 horas de contato sobre 11% e 35% dos isolados, respectivamente. As 6 horas de contato 53% dos isolados já haviam sido inativados, porém, somente as 10 horas é que 100% das amostras estavam inativadas.

Nas densidades populacionais de 10^6 e 10^5 UFC/mL, já nos primeiros minutos de contato o extrato bruto iniciou a promoção da redução de um logaritmo em três (10%) salmonelas, e o ritmo que promoveu a inativação dos isolados foi muito semelhante com o que ocorreu com a maior densidade populacional,

principalmente à partir das 5 horas de contato. Neste tempo de leitura (5 horas) 39 % dos isolados estavam inativados na densidade inicial de 10^6 UFC/mL e 50 % na de 10^5 UFC/mL. As 8 horas de contato 94% estavam inativados na densidade inicial de 10^6 UFC/mL e 98 % na de 10^5 UFC/mL. As 9 horas de contato todos os inóculos estavam inativados.

Comparando o tempo necessário para que o extrato bruto inativasse as cepas padrões com o tempo necessário para inativar os isolados, observa-se que para a maioria dos isolados o tempo de contato precisou ser maior.

Nas densidades 10^6 e 10^5 UFC/mL o tempo de contato para inativar a *Salmonella Choleraesuis* iniciou na leitura de 1 hora de contato, o que ocorreu com apenas um (2%) isolado na densidade 10^5 UFC/mL. E a inativação na densidade 10^6 UFC/mL iniciou na leitura das 2 horas de contato sobre quatro (8%) isolados. Contraditoriamente, na maior densidade, enquanto a inativação da cepa padrão ocorreu as 4 horas (mesmo que densidade populacional tenha reduzido drasticamente na 1 hora, de 10.000.000 UFC para 4 UFC), três (6%) isolados estavam inativados as 2 horas. Deste modo, na densidade 10^7 UFC/mL 37 (72%) isolados precisaram mais tempo de contato para serem inativados, comparados com essa cepa padrão, o mesmo tendo ocorrido com

100% dos isolados na densidade 10^6 UFC/mL e com 49 (96%) dos isolados na densidade 10^5 UFC/mL.

Diferente do que ocorreu com a *Salmonella* Choleraesuis, um menor número de isolados precisou maior tempo de contato para ser inativado comparando com a *Salmonella* Enteritidis. Como essa cepa padrão foi inativada nas 5 horas de contato na densidade de 10^7 UFC/mL, 24 (47%) dos isolados precisaram maior tempo de contato para que o extrato os inativasse. Na densidade 10^6 UFC/mL 21 (41%) e na 10^5 UFC/mL 41 (80%) dos isolados, respectivamente, precisaram mais tempo de contato para inativação.

Esse resultado alerta para que a decisão quanto ao critério tempo de contato para controle de micro-organismos seja baseado no monitoramento da susceptibilidade e sensibilidade da amostra/linhagem presente em cada cenário de situação-problema sanitário, e não unicamente em cepas padronizadas.

A avaliação fitoquímica foi importante para averiguar a identidade e qualidade de *A. satureioides*. Segundo a Farmacopéia Brasileira (1997) e Oliveira et al. (2001), os flavonóides são os componentes preponderantes das inflorescências, aos quais também se atribui algumas atividades farmacológicas interessantes, tal como atividade antimicrobiana. A detecção fitoquímica no

extrato hidroalcoólico de *A. satureioides* apresentou compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis e condensados, flavonóis e saponinas.

Diversos estudos (DESMARCHELIER et al., 1998; BROUSSALIS et al., 1989) estão de acordo com esta pesquisa, pois comprovaram que as partes aéreas de *A. satureioides* possuem diferentes ácidos fenólicos, tais como ácidos caféicos, clorogênicos, isoclorogênicos e glicolipídios. Desmarchier et al. (1998) não cita o tipo de extrato/extração empregada para que chegassem a tal conclusão, porém no experimento utilizaram a infusão e a extração metanólica para a comprovação da atividade antioxidante. Broussalis et al. (1989) utilizaram o extrato metanólico de macela.

Outros autores (Lorenzi e Matos, 2002; Almeida et al., 1998) citaram que esta planta, *A. satureioides*, é rica em flavonóides, incluindo sesquiterpenos e monoterpenos e polissacarídeos. No estudo de Joray et al. (2011) ocorreu o isolamento de um composto antibacteriano no macerado etanólico de *A. satureioides*, proveniente das partes aéreas da planta, denominado de 23-metil-6-O-desmetil auricepirona. Outra pesquisa mostrou estar presente o composto quercitina e 3-O-metilquercitina (Hnatyszyn et al., 2004) no extrato metanólico de *A. satureioides*.

Ferraro et al. (1981) e Both et al (2016) identificaram os compostos quercetina, luteolina e O-metilquercetina como sendo os principais flavonóides existentes no extrato etanólico de macela.

Outro flavonóide identificado foi o achyrobichalcona (Holzschuh et al., 2010; Carini et al., 2013), galangina e isognafalina (CAVALCANTE, 2009). O mesmo autor descreve estar presente em *A. satureioides* ésteres de caleriana, saponinas, taninos, lactonas (substâncias amargas) e óleo essencial. Todos esses estudos estão de acordo com o que foi relatado nesta pesquisa.

Diversos autores estudaram o efeito de diferentes métodos de extração e concluíram que dependendo do método, variações fitoquímicas podem ser encontradas. A infusão de parte aéreas de *A. satureioides*, em 5%, por exemplo, encontrou-se flavonóides (Arredondo et al., 2004; Kadarian et al., 2002; Gugliucci e Menini, 2002) ácidos caféicos e protocatecuico (Kadarian et al., 2002), indo ao encontro do que foi encontrado neste estudo. No extrato etanólico de inflorescências, encontrou-se flavonóides (Langeloh, 1985), assim como nos extratos hidroalcoólicos também, cujos efeitos retardam a multiplicação bacteriana (POLYDORO et al., 2004). No macerado etanólico de partes aéreas Hnatyszyn et

al. (2004) encontraram quercetina e quercetina-3-metil éter.

Conclusões

Na detecção fitoquímica foram identificados compostos fenólicos, como os taninos hidrolisáveis e condensados, flavonóis e saponinas, sendo o achado compatível com o de outros estudos.

Concluiu-se que o extrato bruto apresentou capacidade de inativar as cepas padrões e todas as cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos isoladas em alimentos de origem animal, e que o tempo de contato necessário para que essa atividade acontecesse esteve relacionada com densidade populacional das suspensão e características intrínsecas dos isolados.

Referências

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y los animales. 3 ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2001. 1v. 398p.
2. ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 464p.
3. ARREDONDO, M.F.; BLASINA, F.; ECHEVERRI, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 91, p. 13–20, 2004.
4. AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação

preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.70-78, 2008.

5. BARATA, L.E.S.; ALENCAR, A.A.J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. Plantas Mediciniais Brasileiras. I. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Macela). **Revista Fitos**, v.4, n. 01, p. 120-125, 2009.

6. BOTH, J.M.C.; AVANCINI, C.A.M.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P.R. Atividade desinfetante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e compostos flavonóides em *Achyrocline satureioides* Lam. (macela). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 4, 2016. Disponível em: <<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/515/205>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

7. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.

8. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 46, de 6 de outubro de 2011**: Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_046_de_06-10-2011_regulada_pela_IN_17.pdf>. Acesso em: 03 abril 2016.

9. BRITISH STANDARD (BS). The European Standard EN 1040:2005. **Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase 1)**. London: British Standards Institution. 2006..

10. BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; GURNI, A.; COUSSIO, J. Aspectos fitoquímicos de espécies argentinas del género *Achyrocline*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 8, p. 11-16, 1989.

11. CAMPOS, F.L.; BOTH, J.M.C.; MACIEL, M.J.; AVANCINI, C.A.M. Atividade desinfetante *in vitro* de extrações de *Achyrocline satureioides* DC. Asteraceae (macela) sobre *Candida albicans* padrão. In: Simpósio de Sustentabilidade & Ciência Animal, III, 2013, Pirassununga, Anais. Pirassununga: FMVZ/USP, 21-22 de agosto de 2013. Trabalho 087. Disponível em: <<http://www.sisca.com.br/anais.php>>. Acesso em: 10 abril 2016.

12. CAMPOS, F.L.; VALENTE, P.; ETHUR, E.M.; AVANCINI, C.A.M. Atividade desinfetante do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) sobre *Candida* spp. isoladas em situações-problema de mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.10, n.4, p.327-333, 2016

13. CARINI, J.P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 3131–3144. 2014.

CAVALCANTE, R. Fitodontologia. 1 ed. São Paulo : Câmara Brasileira do Livro, 2009. 189p.

14. CHAPMAN, J.S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **Int Biodeterior Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271-276, 2003.
15. DARROW, K.; BOWERS, M.D. Phenological and Population Variation in Iridoid Glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n.1, p. 1-11, 1997.
16. DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 9, n. 31, p. 1163-1170, 1998.
17. EUROPEAN COMMISSION (EU) - SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR). Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides: antibiotic resistance effects of biocides. Brussels: European Commission, 2009. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.
18. FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B.. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.49-54, 2007.
19. FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis : UFRGS Editora/ Editora da UFSC, 2003. cap. 10, p. 229-245.
20. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed. São Paulo: Siqueira S.A., 1959.
21. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda. São Paulo, 1988.
22. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu,1997. v. 2.
- FERNANDEZ, V.N.V.; SILVA, R.K.P.; XIMENES, R.S.F.; AVANCINI, C.A.M.. Atividade desinfetante e antisséptica de extrações de plantas nativas do sul do Brasil, frente bactérias de interesse na área da Medicina Veterinária : resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C. - Asteraceae - (Macela). Salão de Iniciação Científica (15.:2003 nov. 24-28; UFRGS, Porto Alegre, RS). Disponível em <<http://hdl.handle.net/10183/39910>>. Acesso em: 30 de jun. de 2017
23. FERRARO, G.E., NORBEDO, C., COUSSIO, J.D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, n.20, v. 8, p. 2053–2054, 1981.
24. FISCH, E.; GRAVINO, I.; CORINO, R.B.; AVANCINI, C.A.M. Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração vegetal (decocto) frente microorganismos padronizados de interesse em medicina veterinária : IV-resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C-Asteraceae ("Macela"). Salão de Iniciação Científica (17.:2005). Livro de Resumos. Porto Alegre : UFRGS, 2005. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10183/38439>>. Acesso em 16 de jun. 2017.
25. GRAVINO, I.; CORINO, R.B.; FISCH, E.; AVANCINI, C.A.M. Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração vegetal (decocto) frente microorganismos padronizados de

interesse em medicina veterinária : III- resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C. - Asteraceae ("macela"). Salão de Iniciação Científica (17.:2005). Livro de Resumos. Porto Alegre : UFRGS, 2005. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10183/39038>>. Acesso em 16 de jun. 2017.

26. GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited *in vitro* by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. **Life Science**, n. 71, p. 693–705, 2002.

27. HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 3ed. Chapman and Hall Int. Ed., New York, 1998.

28. HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A.; COUS-SIO, J.; FERRARO, G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of *Guinea pig corpus cavernosum*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 366–369, 2004.

29. HOLZSCHUH, M.H.; GOSMANN, G.; SCHNEIDER, P.H.; SCHAPOVAL, E.E.S., BASSANI, V.L. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. **Pharmazie**, n. 65, p. 650–656, 2010.

30. JORAY, M.B.; Del ROLLÁN, M.R.; RUIZ, G.M.; PALACIOS, S.M.; CARPINELLA, M.C.. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina: isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. **Planta Medica**, n. 1, v. 77, p. 95-100, 2011.

31. KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A.M.; MIÑO, J.; LÓPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Pharmacological Research**, v. 45, p. 57–61, 2002.

32. LANGELOH; A. Atividade antiespasmódica do extrato alcoólico de marcela (*Achyrocline satureioides*, DC. Lam.). **Caderno de Farmácia- UFRGS**, v. 1, n. 1, p. 38-44, 1985.

33. LEMOS, G.C.S.; OLIVEIRA, L.O.; EBERLI, B.B.; MOTA, O.V.; FOLLY, M.M. Bactericidal activity of macela *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC) and jaborandi-falso (*Piper aduncun L.*) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 1, n.3, p. 67-72, 2000.

34. LORENZI, H.; MATOS, F.JA. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 512p.

35. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, JM.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. . Microbiologia de Brock. 12 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2011. 1128 p.

36. MOTA, F.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 298-304, 2011.

37. OLIVEIRA, A.L. PADILHA, C.D.; GONZALES ORTEGA, G; PETROVICK, P.R.. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 33-38, 2001.
38. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD GINEBRA (OMS). Estrategia de La OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. 2002. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf> Acesso em: 03 fev. 2012.
39. PEREZ, C.; ANESINI, C.. *In vitro* antibacterial activity of argentine folk medicinal plants agaisnt *Salmonella typhi*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 44, p. 41-46, 1994.
40. POLYDORO, M.; DE SOUZA, K.C.B.; ANDRADES, M.E.; DA SILVA, E.G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L.; MOREIRA J.C.F.. Antioxidant, pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sci**, v.23, n.74, p.2815-2826, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320504001225>>. Acesso em: 06 Jan. 2015.
41. RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S.A.; BANDONI, A.L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Industrial Crops and Products** v. 38, 27– 38, 2012.
42. RIVERA, F.; GERVAZ, E.; SERE, C.; DAJAS, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p. 359–362, 2004.
43. SABINI, M.C.; CARIDDI, L.N.; ESCOBAR, F.M.; MAÑAS, F.; COMINI, L.; REINOSO, E.; SUTIL, S.B.; ACOSTA, A.C.; NÚÑEZ MONTOYA, S.; CONTIGIANI, M.S. ; ZANON, S.M.; SABINI, L.I. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 463–470, 2013.
44. SALGUEIRO, A.C.F.; FOLMER, V.; ROSA, H.S. DA; COSTA, M.T.; BOLIGON, A.A.; B, PAULA, F.R.; ROOS, D.H.; PUNTEL, G.O. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 6 – 14, 2016.
45. SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. (eds).. Diseases of swine. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, 2000. Cap. 39, p.535-551.
46. SILVA, R.K.P.; CARLI, C.M.; AVANCINI, C.A.M. Atividade antibacteriana desinfetante "*in vitro*" de extração vegetal (decocto) frente a microorganismos padronizados de interesse em Medicina Veterinária: resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C. - Asteraceae ("Macela") Salão de Iniciação Científica)16. : 2004 : Porto Alegre) Livro de Resumos. Porto Alegre : UFRGS, 2004. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/54059>>. Acesso em: 10 jun. 2017.
47. SIMÕES, C.M.O. Investigação química-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (macela). Curso de Pós-Graduação em Farmácia/UFRGS, Porto Alegre, RS, 1984. 86p. (Dissertação - Mestrado) -

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984.

[e/antimicrobials_human.pdf](#)>. Acesso em: 18 out. 2012.

48. SPEROTTO, V.R.; MURARI, A.L.; SILVA, D.A.R.; POSSENTI, C.G.R.; WIEST, J.M.; AVANCINI, C.A.M. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**. n. 40, v. 3, p. 1-7, 2012.

49. SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B., JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; FILHO, J.L.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 13, p. 1675-1683, 2008.

50. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Controle do crescimento microbiano. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6 ed. Porto Alegre : Artmed, 2003. 827p. Cap. 7, p. 181-206.

51. VOSS- RECH, D.; KLEIM, C.S.; TECHIOLL, V. H.; SCHEUERMANN, G.N.; RECH, G.; FIORENTIN, L. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p.314-320, 2011.

52. WIEST, J. M. et al. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2009.

53. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial Resistance due to Non-Human Antimicrobial Use**. Report of the Second WHO Expert Meeting Copenhagen, 29–31 May 2007. Disponível em: <http://www.who.int/foodborne_disease/resistanc