

MARTHA ISABEL REALPE ARANDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA
2,2',4-TRIIDROXI-BENZOFENONA SOBRE BACTÉRIAS
PATOGENICAS DE AVES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R288a
2016 Realpe Aranda, Martha Isabel, 1986-
Avaliação do potencial antimicrobiano da
2,2',4-Triidroxi-benzofenoma sobre bactérias patogências de
aves / Martha Isabel Realpe Aranda. – Viçosa, MG, 2016.
xii, 45f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.36-43.

1. Aves - Doenças - Tratamento. 2. 4-
triidroxi-benzofenona. 3. Aves - Bactérias patogências.
4. Sinergia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

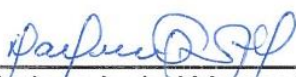
CDD 22 ed. 636.089014

MARTHA ISABEL REALPE ARANDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA
2,2',4-TRIIDROXI-BENZOFENONA SOBRE BACTÉRIAS
PATOGENICAS DE AVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de julho de 2016.



Marlene Isabel Vargas Viloria



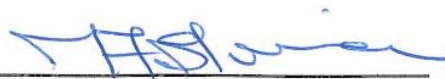
Bernadete Miranda dos Santos



Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)



Marcelo Henrique dos Santos
(Coorientador)



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

A Deus
Ao meu amado filho
Ao meu companheiro de vida
Aos meus pais, irmãos e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Sou especialmente grata ao programa de pos graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa-Brasil por brindar-me a oportunidade como estrangeira de cursar o mestrado.

Meus profundos agradecimentos à minha orientadora, professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, pelas sugestões que me deu para aperfeiçoar o projeto e pelo crédito de confiança e autonomia que me deu para desenvolvê-lo.

Meu especial agradecimento ao professor Leandro Licursi, coorientador desta dissertação, pela paciência, pela solidariedade acadêmica e interesse com que aceitou meu projeto de pesquisa e pelas valiosas indicações.

Desejo agradecer ao professor Marcelo dos Santos, coorientador desta dissertação, pela enorme contribuição na realização deste trabalho e pela disponibilidade em me ajudar.

Agradeço aos Colegas e técnicos do laboratório de Doenças Bacterianas.

Agradeço ao Professor Joaquin Patarroyo - Laboratorio de Biologia e Controle de Hematozoarios e Vetores.

Agradeço muitíssimo ao pessoal do Núcleo de Microscopia pela disponibilidade em me ajudar.

Agradeço aos participantes da banca examinadora, à professora Bernadete Miranda dos Santos e à professora Marlene Isabel Vargas.

Agradeço à CAPES, instituição que financiou a bolsa de estudo, e meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas, instituições e empresas que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARTHA ISABEL REALPE ARANDA, filha de Francisco Realpe e Olivia Aranda, nasceu em Restrepo, Valle del Cauca-Colombia, em 27 de junho de 1986.

Em agosto de 2006 iniciou a graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, na Universidad de Caldas-Colômbia, concluída em julho de 2011. Na graduação fez estágio na Unidade de Estudo em Sanidade Avícola da UFV.

Trabalhou na empresa Pollos El Bucanero S.A.- Colômbia como Médica Veterinária e Zootecnista de aves reprodutores por aproximadamente 3 anos.

Em agosto de 2014 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na UFV, submetendo-se à defesa de sua dissertação em julho de 2016.

Tem experiência na área de Medicina Veterinária Preventiva, com ênfase em Microbiologia e Sanidade Avícola e manejo de aves matrizes de corte.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Importância da avicultura.....	2
2.2 Relevância das bacterioses aviárias	3
2.3 Doenças bacterianas que atingem a indústria avícola	3
2.3.1 <i>Enterite Necrótica</i>	3
2.3.2. <i>Colibacilose</i>	4
2.3.3 <i>Salmonelose</i>	6
2.3.4. <i>Estafilococose aviária</i>	7
2.3.5 <i>Pasteurelose aviária</i>	8
2.4 Doenças aviárias de importância na saúde pública.....	9
2.4.1 <i>Infecção por Clostridium perfringens</i>	9
2.4.2 <i>Infecção por Escherichia coli</i>	9
2.4.3 <i>Infecção por Salmonella spp.</i>	10
2.4.4 <i>Infecção por Staphylococcus aureus e intoxicação alimentar</i>	10
2.4.5 <i>Infecção por Pasteurella spp</i>	11
2.5 Utilização de antimicrobianos na produção avícola	11
2.6 Benzofenonas	12
2.7 Regra química para o desenvolvimento de novos fármacos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Antimicrobianos	15
3.1.1 <i>Benzofenonas</i>	15
3.1.2 <i>Antimicrobiano convencional (método checkerboard)</i>	15
3.2 Isolados bacterianos	15
3.2.1 <i>Origem e acondicionamento</i>	15
3.2.2 <i>Preparo do inóculo bacteriano para teste de microdiluição</i>	16
3.3 Atividade antimicrobiana	16

3.3.1	Determinação concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC).....	16
3.4	Avaliação da citotoxicidade.....	17
3.4.1	Animais.....	17
3.4.2	Declaração de ética.....	17
3.4.3	Teste de hemólise	17
3.5	Método <i>checkerboard</i>	18
3.6	Ação da benzofenona na parede bacteriana	20
3.6.1	Liberação de proteína-Bradford	20
3.6.2	Citometria de fluxo.....	20
3.6.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	20
3.7	Análise estatístico.....	21
4.	RESULTADOS	22
4.1	Atividade antimicrobiana MIC e MBC	22
4.2	Teste de hemólise	24
4.3	Método <i>checkerboard</i>	24
4.4	Ação da benzofenona na parede bacteriana	26
4.4.1	Liberação de proteína.....	26
4.4.2	Citometria de fluxo.....	26
4.4.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	28
5.	DISCUSSÃO	31
6.	CONCLUSÕES	35
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	36
8.	ANEXOS.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química de benzofenonas naturais (1, 2 e 3), benzofenona sintética (4)..... 12
- Figura 2.** Esquema do método *checkerboard* para avaliação do efeito sinérgico da benzofenona com bacitracina frente ao inoculo bacteriano.....22
- Figura 3.** Atividade antimicrobiana do composto 2,2',4-triidroxibenzofenona e bactérias ATCC e Isolados de campo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. Cada ponto representa o valor da média e o desvio padrão da média ($P >0,05$) indicando que não houve diferença significativa..... 23
- Figura 4.** Atividade hemolítica da 2,2',4-triidroxibenzofenona as concentrações diferentes sobem os eritrócitos de galinha. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e três repetições, cada ponto representa o valor da média e o desvio padrão da média. 24
- Figura 5.** Efeito da 2,2',4-triidroxibenzofenona no extravasamento de proteínas de isolados bacterianos. Cada ponto representa o valor da média e o desvio padrão da média. A: benzofenona 2 mg/mL, B: benzofenona 1 mg/mL..... 26
- Figura 6.** Subpopulações da bactéria de campo *S. Typhimurium* após o contato com a 2,2',4-triidroxibenzofenona (2 mg/mL) avaliadas no citrometro de fluxo. (A) sem benzofenona, (B) e (C) 1 hora, 2 horas após o tratamento. Iodeto de Propídio PI..... 27
- Figura 7.** Subpopulações da bactéria de campo *S. aureus* após o contato com a 2,2',4-triidroxibenzofenona (1 mg/mL) avaliadas no citrometro de fluxo. (A) sem benzofenona, (B) e (C) 1 hora, 2 horas após o tratamento. 28
- Figura 8.** Resultado da presença da adição da 2,2',4-triidroxibenzofenona (2 mg/mL) em cultura *Salmonella Typhimurium* isolado de campo utilizando microscopia electrónica de transmissão. (A) sem benzofenona, (B), (C) e (D) 1 hora, 2 horas e 3 horas após o tratamento respectivamente. Escala de barra é de 1 μ m. 29

Figura 9. Resultado da presença da adição da 2,2',4-triidroxibenzofenona (1 mg/mL) em cultura *Staphylococcus aureus* isolado de campo utilizando microscopia electrónica de transmissão. (A) sem benzofenona, (B), (C) e (D) 1 hora, 2 horas e 3 horas após o tratamento respectivamente. Escala de barra é de 1 µm. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (MIC) do composto 2,2',4-triidroxi benzofenona e bactérias ATCC e isolados de campo que afetam à avicultura e saúde pública. 22

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (MIC) de antimicrobianos usados no tratamento sob bactérias patogênicas de aves 25

Tabela 3. Interações da benzofenona com a bacitracina em bactérias ATCC. 25

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPA:** Associação Brasileira de Proteína Animal
- ATCC:** *American type culture collection*
- BSA:** albumina de soro bovina.
- CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- C. perfringens:** *Clostridium perfringens*
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- D.O.:** Densidade ótica
- E. coli:** *Escherichia coli*
- ECPA:** *Escherichia coli* patogênica aviária
- EN:** Enterite necrótica
- FIC_i:** Índice de fracção de concentração inibitória.
- IP:** Iodeto de Propídio.
- MBC:** Concentração bactericida mínima
- MIC:** Concentração inibitória mínima
- S. Arizonae:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Arizonae
- S. Enteritidis:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis
- S. Gallinarum:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum
- S. Pullorum:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum
- S. Typhimurium:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium
- S. aureus:** *Staphylococcus aureus*
- PA:** Pasteurelose aviária
- P. multocida:** *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*
- TSA:** *Tryptic Soy Agar*
- TSB:** *Tryptic Soy Broth*
- UFC:** Unidade de formação de colônias

RESUMO

REALPE ARANDA, Martha Isabel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Avaliação do potencial antimicrobiano da 2,2',4-triidroxi-benzofenona sobre bactérias patogênicas de aves.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Marcelo Henrique dos Santos e Leandro Licursi de Oliveira.

Na avicultura, a disseminação de patógenos bacterianos e a ocorrência de surtos, determinam elevados prejuízos econômicos. Muitas destas bactérias são zoonóticas, causando grande preocupação em termos de saúde pública. Os agentes antimicrobianos são importantes para a prevenção e tratamento destas infecções. No entanto, o uso indiscriminado destas moléculas proporciona condições favoráveis para a seleção, propagação e persistência de bactérias resistentes. Na procura de novas moléculas antimicrobianas, as benzofenonas vêm despertando grande interesse, no entanto, a atividade antibacteriana nunca foi pesquisada anteriormente no composto sintético 2,2',4-triidroxibenzofenona. Este trabalho, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano de 2,2',4-triidroxibenzofenona em agentes etiológicos de doenças importantes, verificar o efeito citotóxico, o efeito sinérgico com antimicrobianos convencionais, além de analisar o sítio de ação. Os resultados sugerem que a benzofenona possui atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas testadas e não induz efeitos tóxicos nas células animais. Observou-se que a benzofenona atua sobre a parede bacteriana. E encontrou-se efeito sinérgico com a bacitracina. A benzofenona é uma candidata promissora a ser usada no tratamento das bacterioses avícolas.

ABSTRACT

REALPE ARANDA, Martha Isabel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Evaluation of potential antimicrobial of 2,2',4-trihydroxybenzophenone in pathogenic bacteria of poultry.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Marcelo Henrique dos Santos and Leandro Licursi de Oliveira.

In poultry, the spread of bacterial pathogens and the occurrence of outbreaks, determine high economic losses. Many these bacteria are zoonotic, causing great concern in terms of public health. Antimicrobial agents are important for the prevention and treatment these infections. However, indiscriminate use of molecules provides favorable conditions for selection, propagation persistence and resistant bacteria. In searching for new antimicrobial molecules, benzophenones have attracted great interest, however, the antibacterial activity has never been previously searched in synthetic 2, 2',4-trihydroxybenzophenone. This study aimed to evaluate the antimicrobial potential of synthetic 2,2 ', 4-trihydroxybenzophenone in etiologic agents of important diseases in poultry, the cytotoxic effect, synergistic effect with conventional antimicrobial agents, in addition analyze the site of action . The results suggest that the benzophenone has antimicrobial activity to Gram-negative and Gram-positive bacteria and induces no toxic effects in animal cells. The benzophenone acts in the bacteria cell wall. In addition, the benzophenone had synergistic effect with bacitracin. The 2,2',4-trihydroxybenzophenone is a promising candidate to be used in the treatment of bacteremia poultry.

1. INTRODUÇÃO

A produção avícola é provavelmente a mais globalizada indústria na produção de alimentos no mundo. A carne de frango e ovos são as principais fontes de alimento para solucionar o rápido crescimento populacional, considerando que os custos de produção são baixos, além da ausência de restrições religiosas para o consumo (LANDONI; ALBARELLOS, 2015)

Os rápidos avanços da tecnologia e competitividade da indústria avícola nas últimas décadas impulsionaram condições extremas a saúde animal pois, os atuais sistemas da produção embasam-se em alta densidade animal, proporcionando condições ideais para a multiplicação e disseminação de patógenos e assim surtos de doenças que podem ocorrer, causando sensíveis prejuízos à agroindústria avícola. Entre os patógenos, há aqueles relacionados à saúde pública, ampliando mais a importância da prevenção e controle. Além disso, a desenfreada utilização de antimicrobianos para tratamento, controle e como promotores de crescimento proporcionam condições favoráveis para a seleção, propagação e persistência de bactérias resistentes, tanto em animais e humanos.

As benzofenonas naturais, importantes antimicrobianos, possuem uma boa atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, não sendo citotóxicas para as células de mamíferos. Com base nos resultados de inibição bacteriana obtidos em outros derivados das benzofenonas naturais e na procura de novas moléculas antimicrobianas, o presente estudo é o primeiro em avaliar o potencial antimicrobiano do composto sintético 2,2',4-triidroxibenzofenona contra um grande painel de bactérias ATCC e isolados de campo de importância na avicultura e saúde pública. Verificou-se o efeito citotóxico em hemácias de galinha, efeito sinérgico com antimicrobianos usados no tratamento e como promotores de crescimento na avicultura, além de analisar o sítio de ação da benzofenona.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da avicultura

A carne de frango e os ovos são as principais fontes de alimento para o rápido crescimento populacional, considerando que os custos de produção são baixos e as preferências alimentares pelos consumidores. Assim, a produção avícola é provavelmente a mais generalizada indústria de produção de alimentos no mundo (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

O Brasil apesar de ter iniciado sua produção na década de 1970, já se coloca entre os principais produtores mundiais, sendo superado apenas pelos Estados Unidos, e é o primeiro colocado nas exportações de carne de aves (ABPA, 2016).

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016), a produção de carne de frango totalizou no ano 2015 em 13.14 milhões de toneladas e aproximadamente 39,5 mil milhões de ovos de galinha. A produção brasileira tem permitido atender ao crescimento da demanda interna e das exportações, as quais têm crescido e já atingem 30% do volume total produzido.

No que se refere ao mercado, o consumidor interno tem mudado seu hábito de consumo de carnes, passando de um país preponderantemente consumidor de carne bovina para consumidor da carne de frango. A qualidade, a imagem de produto saudável e preços acessíveis auxiliaram a conquista dessa posição. O consumo *per capita* de carne de frango e ovos no Brasil apresentou grande evolução, considerando que, em meados dos anos de 1970, o consumo de carne de frango era menor que 4 KG por pessoa/ano e 40 ovos/pessoa, atingindo no ano de 2015 em 43.25 KG por pessoa/ano e 191 unidades de ovo/ano (ABPA, 2016).

A importância da avicultura no contexto socioeconômico brasileiro se reflete em gerar milhões de empregos, diretos e indiretos. Gera também um movimento global na economia brasileira, exigindo pequena área de terra para a instalação do aviário, além de utilizar terras desvalorizadas concorrendo para a recuperação dessas áreas, possuindo alta capacidade de rendimento e tem giro rápido de capital (ALBINO; TAVERNARI, 2008). A produção avícola comercial é um sistema agrícola muito intensivo, significando que o controle de doenças e a prevenção deve ser um foco importante.

2.2 Relevância das bacterioses aviárias

Os rápidos avanços da tecnologia e competitividade da indústria avícola nas últimas décadas impulsionaram condições extremas à saúde animal, uma vez que os atuais sistemas de produção se embasam em alta densidade animal, geralmente em uma área geográfica específica, proporcionando condições ideais para a multiplicação e disseminação de patógenos e a ocorrência de surtos de doenças que determinam sensíveis prejuízos à agroindústria. Dentro desses patógenos, há aqueles mais relevantes na saúde pública, ampliando a importância da prevenção e controle (ANDREATTI et al., 2006), além da desenfreada utilização de antimicrobianos para o tratamento e como promotores de crescimento, proporcionando condições favoráveis para a seleção, propagação e persistência de bactérias resistentes, tanto em animais quanto em humanos.

2.3 Doenças bacterianas que atingem a indústria avícola

2.3.1 Enterite Necrótica

A enterite necrótica (EN) é caracterizada por inflamação e necrose do trato gastrointestinal com um declínio significativo no desempenho do crescimento e um aumento maciço na mortalidade, sendo esta a doença entérica mais comum em frangos de corte (COOPER et al., 2013). A infecção nas aves também pode causar dermatite necrótica e colangiohepatite, (HAFEZ, 2011)

A EN é causada por *Clostridium perfringens*, bactéria Gram-positiva, anaeróbica formadora de esporos, móvel através do pili tipo IV, e produz várias enzimas e toxinas responsáveis pelos sintomas e lesões (VAN IMMERSSEEL et al., 2009). Cepas de *C. perfringens* (A, B, C, D e E) são classificadas de acordo com a produção de quatro grandes toxinas extracelulares alfa (a), beta (b), epsilon (3) e iota (i) (PETIT et al., 1999). Nas aves, a EN foi reportada em maior número por Tipo A e, em menor, por tipo C. O agente pode ser encontrado na cama de frango, fezes, solo, poeira e em conteúdo intestinal de aves saudáveis (DAHIYA et al., 2005). É esperado que um pequeno número de *C. perfringens* seja residente, ou transitoriamente permanentemente no trato gastrointestinal da maioria das espécies de aves (COOPER; SONGER, 2009) . Quando a carne desses animais é analisada para *C. perfringens*, em alguns casos até 84% das amostras de carne são positivas (CRAVEN et al., 2001).

O custo total da EN em surtos no mundo é estimado em mais de US \$ 6 bilhões por ano (WADE; KEYBURN, 2015). Doenças entéricas são um dos problemas mais importantes da indústria avícola devido a grandes perdas econômicas pela diminuição do ganho de peso, aumento das taxas de mortalidade, pior conversão alimentar, maiores custos de medicação e aumento do risco de contaminação de produtos de aves para consumo humano (TIMBERMONT et al., 2011).

2.3.2. Colibacilose

Escherichia coli patogênica aviária (ECPA) causa uma variedade de doenças extra-intestinais na avicultura como: colisepticemia, peritonite, onfalite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada, e outras síndromes (LISTER et al., 2008). Na colisepticemia as aves afetadas mostram pericardite, hepatite, aerosaculite e peritonite. Em galinhas poedeiras é frequente a peritonite e os achados de necropsia incluem salpingite e impactação do oviduto. A infecção do saco vitelino ocorre através da contaminação do umbigo ou ovos contaminados para incubação. Aves afetadas mostram septicemia e inflamação do saco da gema. No coligranuloma são encontrados nódulos no mesentério e na parede

dos intestinos, especialmente no ceco. A síndrome da cabeça inchada consiste em uma celulite aguda periorbital (NOLAN et al., 2013). A ECPA é causada pela bactéria *Escherichia coli* que pertence à família Enterobacteriaceae, Gram negativa, podendo ser móvel ou imóvel (NOLAN et al., 2013).

A ECPA causa perdas econômicas em centenas de milhões de dólares em todo o mundo na avicultura, principalmente pela mortalidade, aumento das taxas de condenação das carcaças no momento do processamento, diminuição da taxa de crescimento, diminuição da eficiência e conversão alimentar das aves afetadas (DZIVA; STEVENS, 2008), (SCHOUER et al., 2012). No Brasil, maior exportador mundial de carne de frango, a ECPA é responsável pelo 45.2% das carcaças de aves condenadas (FALLAVENA et al., 2000). Além do impacto econômico negativo, a ECPA também é considerada uma importante fonte para disseminar a resistência antimicrobiana a outras bactérias, principalmente através de seus plasmídeos e troca de outro material genético (GYLES, 2008). Isto é aparente na Europa, EUA e Austrália, onde até 92% dos isolados de *E. coli* aviária eram resistentes a três ou mais drogas antimicrobianas, apesar das medidas rigorosas sobre o uso de antibióticos na avicultura industrial (GYLES, 2008).

Tem-se relatado o potencial zoonótico de certos grupos clonais tais como: O1: K1: H7 (JOHNSON et al., 2007), (MORA et al., 2010), O18:K1: H7 (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006), O25b: K1:H4 (MORA et al., 2010) . De fato, as aves podem ser a fonte de alimento animal mais estreitamente ligada a *E. coli* extra intestinal patogênica em humanos (GRIFFIN et al., 2012). A colibacilose pode ser controlada por agentes antimicrobianos, mas, os resíduos de tais agentes em alimentos é uma grande preocupação, especialmente quando o surgimento de *E. coli* uropatogênica resistentes à drogas tem tido aumento significativo com alto risco de falha no tratamento de infecções humanas (PALLET; HAND, 2010). O aparecimento da multirresistência entre as cepas da *E. coli* patogênicas aviárias criou grandes preocupações econômicas e de saúde (DHEILLY et al., 2013), (MELLATA, 2013), (DOU et al., 2015).

2.3.3 Salmonelose

A salmonelose é causada pela bactéria do gênero *Salmonella*, enteropatogênica facultativa Gram-negativa, isolada tanto em infecções de seres humanos como de animais (AARTS et al., 2011). As salmoneloses aviárias podem ter três apresentações distintas, a pulorose, cujo agente é *S. Pullorum*, tifo aviário causado por *S. Gallinarum* e paratifo aviário causado por qualquer outra *Salmonella* que não seja *S. Pullorum* ou *S. Gallinarum* (GAST, 2013).

Pulorose: Os sinais clínicos são geralmente observados em aves com menos de três semanas de idade, ou morrem rapidamente após a eclosão no incubatório, devido à peritonite e septicemia (BARROW; NETO, 2011).

Tifo aviário: Causado por *S. Gallinarum*, afeta principalmente aves em crescimento e adultos e casos agudos de infecção estão relacionados com septicemia. Surtos subagudos podem causar mortalidade embrionária ou pintos mortos nas bandejas de incubação. Cronicamente as aves afetadas mostram anemia e necrose focal no fígado, coração, intestinos e pâncreas (BARROW; NETO, 2011).

Paratifo aviário: Dentro deste grupo estão incluídos serovares de *Salmonella* associadas a doenças humanas de origem alimentar, como: *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Os membros desse grupo são encontrados numa vasta gama de espécies (aves, mamíferos, répteis, peixes e insetos). *S. enterica* produz tiflíte em aves jovens e lesões em baço, pulmões, fígado e rins (GAST, 2013).

Arizonose: (*S. Arizonae.*): Afeta principalmente perus, mas também é encontrada em galinhas e patos. Os sinais clínicos são semelhantes aos observados em casos de salmonelose, mas, adicionalmente, a arizonose é caracterizada pela retinite e encefalite.

A salmonelose é responsável por cerca de 1.2 milhões de casos de gastroenterite em humanos anualmente nos Estados Unidos (SCALLAN et al.,

2011) e possui uma estimativa de 93.800.000 de casos no mundo todo a cada ano (MAJOWICZ et al., 2010). O consumo de produtos avícolas contaminados continua a ser um importante fator de risco para a infecção (GUO et al., 2011). *S. Typhimurium* é o agente etiológico mais presente em salmonelose humana na Europa (EFSA/ECDC, 2013), sendo as aves um importante reservatório (MUGHINI-GRAS et al., 2014, LÖFSTRÖM et al., 2015). *S. Typhimurium* têm sido associados com múltiplos surtos de origem alimentar na Austrália, que são epidemiologicamente ligados ao consumo de ovos (MCWHORTER et al., 2015), (MUSTO et al., 2016), ou frango (FEARNLEY et al., 2011).

Há também relatos de infecções por *Salmonella* consideradas altamente resistentes aos medicamentos para humanos, surgindo em diferentes regiões do mundo (TU et al., 2015), (CUI et al., 2016). Embora as fontes destas infecções nem sempre sejam facilmente visíveis, esses dados apontam para uma preocupante progressão e menos opções terapêuticas para o tratamento de casos dessa enfermidade (COLLIGNON, 2013).

2.3.4. Estafilococose aviária

Staphylococcus aureus pode causar septicemia, artrite fibrinosa, tenossinovite, condronecrose e osteomielite (também chamado de necrose da cabeça do fêmur) em frangos, perus, patos e gansos. Também pode ocorrer a infecção por trauma, estresse e na incubação dos ovos contaminados. *S. aureus* é um habitante normal da pele e das vias respiratórias superiores em aves doentes e saudáveis e está presente em altos níveis no ambiente do aviário e nas rações para animais (PETON; LE LOIR, 2014).

Portanto, *S. aureus* tem um grande impacto sobre a saúde e o bem-estar animal, causando grandes perdas econômicas na produção avícola mundial devido, principalmente, à diminuição do ganho de peso, diminuição da produção de ovos, e condenação das carcaças no abate (MCNAMEE et al., 2000).

S. aureus é uma das principais bactérias oportunistas em seres humanos e sua importância se dá devido ao efeito deletério sobre a saúde animal e sua

potencial transmissão de animais para humanos, e vice-versa (PETON; LE LOIR, 2014). A análise genética mostrou que as estirpes nas aves que predominam atualmente surgiram após uma interação homem-ave e uma subsequente evolução adaptativa, levando à formação de clones que estão intimamente relacionados e, principalmente, agrupados em CC5, um complexo clonal que também compreende linhagens humanas associadas (LOWDER et al., 2009).

2.3.5 *Pasteurelose aviária*

Pasteurelose aviária (PA) é uma doença contagiosa que afeta aves domésticas e selvagens. Caracteriza-se por lesões hemorrágicas e alta mortalidade, variando de acordo com a forma de apresentação da infecção, que depende da patogenicidade do agente e da suscetibilidade do plantel. A apresentação aguda está relacionada com septicemia, produzindo petéquias no coração, na mucosa da moela e na gordura abdominal. Nos casos crônicos, as lesões envolvem o trato respiratório (pneumonia fibrinonecrótica e pleurite fibrinopurulenta), conjuntiva, seios infra-orbitais e trato reprodutivo. PA também está relacionada com a dermatite fibrinonecrótica afetando o dorso, abdômen e peito (Glisson et al., 2013).

A pasteurelose é causada pela bactéria Gram-negativa *P. multocida*. Sua morfologia é a de um bastonete pequeno (bipolar), podendo ser aeróbio ou anaeróbio facultativo, imóvel não formador de esporos e apresentar ou não cápsula. As doenças causadas por estirpes de *P. multocida* que pertencem aos sorotipos capsular (A, B, D, E e F) e somática (1-16) são conhecidas por afetarem grande variedade de aves das espécies domésticas e selvagens no mundo todo, com abundante perda econômica, especialmente em regiões tropicais (KUMAR et al., 2004), (SHIVACHANDRA et al., 2006). As aves silvestres e mamíferos podem ser fonte de contaminação para os planteis, onde o agente dissemina-se rapidamente por contato direto de ave para ave, água de bebida, fômites e instalações. O uso de antibióticos é um método eficaz para controlar a infecção por *Pasteurella*, entretanto, a resistência aos antibióticos é cerca do 80,5% (KEHRENBURG et al., 2001).

2.4 Doenças aviárias de importância na saúde pública

2.4.1 Infecção por *Clostridium perfringens*

C. perfringens causa duas formas diferentes de doenças, pode ser causada geralmente pelas enterotoxinas das cepas de tipo A, e raramente por tipo C (BRYNESTAD; GRANUM, 2002). *C. perfringens* tipo A, induz uma intoxicação alimentar quando a bactéria esporula nas células vegetativas do intestino. Os sinais são dor abdominal aguda, cólicas, náuseas e diarreia (SONGER, 2010). A bactéria tipo C está associada com a enterite necrótica em seres humanos. Os sintomas incluem dor abdominal agudo e distensão, diarreia com sangue, e às vezes vômito. *C. perfringens* é um habitante comum do solo e intestino de animais e seres humanos, e é geralmente isolada a partir de produtos de carne de varejo, incluindo aves. Doenças transmitidas por *C. perfringens* presentes no alimento resulta de técnicas impróprias de manipulação de carnes incluindo as de aves (ANDERSSON; RONNER, 1995). A exposição direta a pessoas ou animais infectados não constitui um risco de doença, mas os indivíduos infectados podem servir como uma fonte de contaminação alimentar (HEIKINHEIMO et al., 2006).

2.4.2 Infecção por *Escherichia coli*

O patótipo O157:H7 da *E. coli* enterohemorrágica induz em humanos cólicos abdominais inicialmente com uma diarreia aquosa progredindo a diarreia sanguinolenta em 1-4 dias e insuficiência renal aguda de 5-13 dias após o início da diarreia. Infecções de *E. coli* extra-intestinal estão associados com uma variedade de doenças, incluindo a infecção do trato urinário, meningite do recém-nascido, e septicemia (PENNINGTON, 2010). A toxina Shiga das cepas *E. coli* enterohemorrágica têm sido anteriormente identificados em amostras de carne frango e em fezes coletadas de perus e pombos. Transmissão de estirpes de *E. coli* enterohemorrágica ocorre através de alimentos contaminados, contato pessoa-a-pessoa, ou contato com animais infectados. Infecções humanas com estirpes de *E. coli* patogênica extra-intestinal normalmente se originam do

próprio trato intestinal da pessoa, embora as aves podem ser potenciais reservatórios para a infecção e contaminação humana (JOHNSON et al., 2008).

2.4.3 Infecção por *Salmonella* spp.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram os dois sorotipos não-tifóide mais comuns isolados a partir de humanos (HENDRIKSEN et al., 2011). Salmonelose não-tifóide normalmente se manifesta como uma doença aguda com enterocolite ou gastroenterite com dor de cabeça, dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos, e febre (DHANOA; FATT, 2009). Salmonellas não-tifóideas são capazes de colonizar o trato gastrointestinal de uma ampla gama de hospedeiros animais selvagens e domésticos, incluindo aves. A transmissão ocorre por via oral-fecal e por contato direto com fezes de animais infectados ou indiretamente pelo consumo de produtos alimentares contaminados, e a transmissão secundária pode ocorrer por higiene não apropriada (GAL-MOR; BOYLE, 2014).

2.4.4 Infecção por *Staphylococcus aureus* e intoxicação alimentar

S. aureus causa uma grande variedade de manifestações clínicas que varia desde pústulas na pele, septicemia até óbito (WERTHEIM et al., 2005). Infecções cutâneas comuns incluem impetigo, celulite, foliculite, carbúnculos, furúnculos e abscessos. Infecções localizadas podem levar complicações, incluindo artrite, endocardite, osteomielite, pneumonia, meningite e septicemia. A intoxicação é mediada pela produção de enterotoxinas em alimentos crus ou inadequadamente refrigerados. As intoxicações alimentares incluem sinais agudos de náusea, dores abdominais, vômitos, e muitas vezes diarreia. *S. aureus* é também o causador do choque tóxico em seres humanos (LOWY, 1998). A transmissão ocorre por contato direto ou indireto. As mãos é o mais importante veículo para a transmissão, e, pelo menos, um terço de infecções de pele acredita-se resultar de autoinfecção. Transmissão por via aérea é incomum, mas pode ocorrer como consequência de espirros por portadores nasais. A carne de frango é frequentemente contaminado com estirpes enterotoxigênicas de *S.*

aureus, embora manipuladores de alimentos infectados são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação de origem alimentar (KITAI et al., 2005).

2.4.5 Infecção por *Pasteurella* spp

Os seres humanos adquirem a infecção pela bactéria principalmente através do contato com animais, a maioria geralmente através de mordidas de animais, arranhões ou contato com secreções mucosas derivadas de animais de estimação (HEYDEMANN; ANTONY, 2010, CHOMEL; SUN, 2011). Os sintomas comuns da pasteurelose em seres humanos são inchaço (edema), celulite (inflamação difusa ou localizada com vermelhidão e dor), e exsudato purulento no local da ferida. Em casos mais graves, a pasteurelose pode rapidamente evoluir para uma bacteremia (GUILBART et al., 2015).

2.5 Utilização de antimicrobianos na produção avícola

Os agentes antimicrobianos são extremamente importantes na prevenção e tratamento de doenças na produção avícola. Os grupos mais comumente usados são os: beta-lactâmicos, polipeptídeos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, florfenicol, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas, fluoroquinolonas e ionóforos. Apesar de debates e controvérsias científicas em relação às consequências potenciais para a saúde pública do uso de agentes antimicrobianos em animais, é impossível imaginar uma indústria avícola sustentável sem usá-los (TURNIDGE, 2004).

Os promotores de crescimento descobertos na década de 1940 são importantes compostos utilizados na avicultura. O mecanismo de ação dos antimicrobianos como promotores de crescimento está relacionado com interações na população microbiana intestinal, sendo utilizadas quantidades subterapêuticas, visando ganho de peso (NIEWOLD, 2007). O aumento da resistência aos antibióticos e a presença de resíduos de drogas em produtos animais levaram a proibir em vários países da Europa e Coreia do Sul o uso

destes fármacos como promotores de crescimento nos alimentos para os animais (CASTANON, 2007) (ALLOUI et al., 2013).

Para a administração dos medicamentos na avicultura, a via oral é eleita porque permite o oferecimento a um grande número de aves a serem tratadas, além do baixo custo. Considerando as propriedades organolépticas e físico-químicas (solubilidade em água, estabilidade, e palatabilidade, etc.), os agentes antimicrobianos podem ser administrados pela água de bebida ou alimentos balanceados (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

2.6 Benzofenonas

As benzofenonas são uma classe de compostos obtidos a partir de fonte natural ou por métodos sintéticos (Figura 1). Eles são de grande importância, fundamentalmente devido a suas diversidades biológicas e químicas. Seus derivados são classes emergentes de moléculas com várias propriedades farmacológicas.

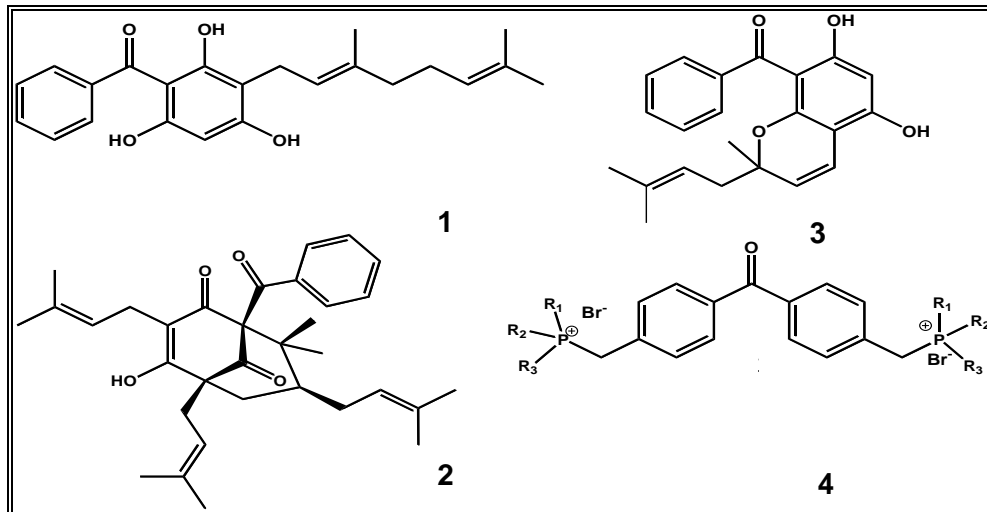


Figura 1 Estrutura química de benzofenonas naturais (1, 2 e 3), benzofenona sintética (4).

Vários análogos de benzofenona são bem conhecidos pelas suas potências antitumoral e antiangiogênico (LAKSHMI et al., 2013, ZABIULLA et al., 2016). Destacam-se também os efeitos antioxidantes (SANG et al., 2002), anti-inflamatório (DORIGUETTO et al., 2007, KHANUM et al., 2010) antiviral (WU et

al., 2012), anti *Leishmania* (MACIEL-REZENDE et al., 2013, DE ALMEIDA et al., 2015) e antimicrobiano. Cita-se alguns trabalhos a seguir sobre atividade antimicrobiana:

Existem relatos indicando que as benzofenonas naturais possuem uma boa atividade contra bactérias como *E. coli*, não sendo citotóxico para as células de mamíferos e inibindo o desenvolvimento da parede celular da bactéria (VOOTURI et al., 2009).

Segundo NALDONI et al., (2009), as benzofenonas 7-epiclusianona e guttiferone-A são promissoras para o controle de bactérias Gram-positivas como: *S. aureus* e *B. cereus*. Outras benzofenonas preniladas naturais têm efeito sobre as bactérias: *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, e *Bacillus subtilis*, (DOS SANTOS et al., 1999). A eficácia dos efeitos inibitórios destas substâncias pode ser atribuída à presença de nucleotídeos aromáticos, contendo grupos polares.

Benzofenonas poliisopreniladas como a pestalone tem atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina e *S. aureus* resistentes a metilina (CUETO et al., 2001).

Benzofenonas a partir de própolis têm sido relatadas com várias atividades biológicas, tais como potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (CUESTA et al., 1999, CASTRO et al., 2009).

Portanto, o composto 2,2',4-triidroxibenzofenona (DORIGUETTO et al., 2007), é um forte candidato para avaliar sua ação em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com base nos resultados de inibição bacteriana obtidos em outros derivados das benzofenonas naturais. E sendo um composto sintético, facilita sua obtenção e produção em maior escala a menor custo nos laboratórios.

2.7 Regra química para o desenvolvimento de novos fármacos

A regra de Lipinski, também denominada de regra dos 5, tem como objetivo estimar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos administrados pela via oral, predizendo a influência da estrutura química na absorção de um composto, uma vez que a previsão dos processos farmacocinéticos logo nos estágios iniciais da pesquisa é de extrema importância para o desenvolvimento de um

candidato a fármaco. Segundo Lipinski, os critérios a serem analisados são: a massa molar, o qual não deve exceder a 500 g/mol; o log P, cujo valor limite é 5; e os grupos doadores (NH + OH) e aceptores (N + O) de ligação de hidrogênio, cujas somatórias não devem ultrapassar a 5 e 10, respectivamente (LIPINSKI et al.,2001)

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais-Brasil nos laboratórios de Doenças Bacterianas, de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, assim como no Núcleo de Microscopia e Microanálise da (UFV).

3.1 Antimicrobianos

3.1.1 Benzofenonas

Foi empregado uma molécula derivada da benzofenona, denominada 2,2',4-triidroxibenzofenona, que foi avaliada isoladamente quanto ao seu efeito antimicrobiano e, posteriormente, associada com um antimicrobiano convencional. Esta molécula, de origem sintética, foi fornecida gentilmente pelo professor Marcelo Henrique dos Santos do Departamento de Química da UFV, MG-Brasil (DORIGUETTO et al., 2007)

Características físico-químicas de 2,2',4-triidroxibenzofenona: fórmula empírica: $C_{13}H_{10}O_4$; massa molar: 230.21 u.m.a.; log P: 3.46; grupos doadores (NH + OH): 3; grupos aceptores (N + O): 4.

3.1.2 Antimicrobiano convencional (método *checkerboard*)

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos para o método *checkerboard* após a realização da MIC: bacitracina (Inlab), lincomicina (Genfar), amoxicilina (Mk), eritromicina (Mk).

3.2 Isolados bacterianos

3.2.1 Origem e acondicionamento

Foram selecionados gêneros e espécies bacterianos envolvidos nas principais doenças que afetam à avicultura e saúde pública. No total, foram usadas 13 isolados bacterianos: três Gram-positivos; *Clostridium perfringens* ATCC 12924, *Staphylococcus aureus* ATCC 27659 e *S. aureus* isolada de campo; 10 Gram-negativos (seis ATCC e quatro isolados de campo): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* ATCC 6530, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella*

enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum ATCC 9184, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum ATCC 9120, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 (Anexo I).

Foram preparadas alíquotas de cada cepa, mantidas em freezer a -80°C (cultura estoque), em solução de glicerol autoclavado a 20 %. Os isolados da *American type culture collection* (ATCC) foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ – Brasil e as bactérias isoladas de campo foram obtidas das bacteriotecas da Universidade Federal de Minas Gerais e do laboratório de diagnóstico de doenças das aves Mercolab Cascavel – PR–Brasil. Todas as bactérias de campo foram isoladas de aves comerciais.

3.2.2 Preparo do inóculo bacteriano para teste de microdiluição

Inicialmente, 50 µL de cada isolado do estoque foi ativado em 3 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Himedia), mantido em estufa a 37°C por 24 horas, para obter a multiplicação bacteriana. Após, cada isolado foi estriado em placas contendo *Tryptic Soy Broth* (TSA) (Himedia) e mantido por 24 horas na estufa a 37°C. Três colônias foram resuspensas em 3mL de caldo TSB e as suas concentrações foram ajustadas para um padrão de 0.5 McFarland, a equivalência aproximada de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL, após contagem realizado previamente. As amostras foram, em seguida, diluídas 1:10.000 em caldo TSB para obter 1×10^4 UFC/mL.

3.3 Atividade antimicrobiana

3.3.1 Determinação concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)

O método de microdiluição em caldo foi feito para a determinação dos valores da MIC seguindo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI, (2012) com algumas modificações. Para isso, a benzofenona foi diluída em 5% de Dimetilsulfóxido, DMSO (Merck) adicionando PBS, nas diluições de 250, 125, 62,50, 31,25, 15,62 e 7,81 µg/mL. Em seguida, cada diluição foi levada aos poços da placa de microtitulação (Sarstedt 42192), adicionando 100 µl do inóculo de cada bactéria (1×10^4 UFC/ml). Para o controle positivo, foram utilizadas suspensões bacterianas em meio TSB, e para o controle negativo foi meio TSB.

A Incubação foi feita a 37°C durante 24h. Em seguida, foi feita a leitura no espectrofotômetro (Thermo scientific, Multiskan FC) com comprimento de onda de 450nm. A porcentagem de sobrevivência bacteriana foi calculada como = $[(\text{média da densidade óptica da amostra} - \text{controle negativo}) / (\text{média da densidade óptica do controle (sem tratamento)} - \text{controle negativo})] \times 100$.

Após a leitura no espectrofotômetro, foram identificados os poços das diluições onde não houve multiplicação bacteriana visível, selecionando 10 µL para serem estriados em placas de ágar TSA, durante 24h a 37°C. Posteriormente, foi feita a contagem de colônias para determinar a concentração bactericida mínima a qual foi definida com base na menor diluição que não houve multiplicação bacteriana.

Todos os ensaios de MIC e MBC foram realizados em três experimentos independentes, com três repetições por experimento.

3.4 Avaliação da citotoxicidade

3.4.1 Animais

Foi obtido 3 mL de sangue por animal, no total de 3 três animais da espécie *Gallus gallus domesticus*, clinicamente sadios, com 40 semanas de idade e peso aproximado de 2.5 kg. A coleta das amostras de sangue foi por meio da punção da veia ulnar empregando tubos com heparina.

3.4.2 Declaração de ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFV com o protocolo n°:47/2015 (Anexo II).

3.4.3 Teste de hemólise

A atividade hemolítica da benzofenona foi realizada empregando os eritrócitos coletados seguindo a técnica descrita previamente por YACOUB et al., (2015). Brevemente, o sangue total foi centrifugado a 1500 x g, 10 min, 20°C, descartando o plasma sanguíneo para a obtenção dos eritrócitos. Após três lavagens com PBS, essa papa de eritrócitos foi usado no teste. Foram adicionados 100µL a cada poço da placa de microtitulação (Sarstedt 42192),

juntamente com 100µL das mesmas concentrações de benzofenona usadas para a MIC. Em seguida a placa foi incubada a 37°C durante 2h. Depois, a placa foi centrifugada a 800xg durante 10 min, transferindo os sobrenadantes para uma nova placa de microtitulação, para analisar a liberação de hemoglobina no espectrofotômetro (Thermo scientific, Multiskan FC) com um comprimento de onda de 405nm. Os controles para 0 e 100% de hemólise consistiram em eritrócitos suspensos em PBS e em 1% de Triton X-100, respectivamente. Todos os ensaios de hemólise foram realizados em três experimentos independentes, com três repetições por experimento. A porcentagem de hemólise foi calculada como:

$$[(A_{405nm,benzofenonas}-A_{405nm,PBS})/(A_{405nm,1\%TritonX-100}-A_{405nm,PBS})] \times 100\%$$

3.5 Método *checkerboard*

Na procura de antimicrobianos convencionais com baixa sensibilidade, usados no tratamento de bacterioses avícolas, para serem usados no método *checkerboard* com a benzofenona em estudo, foi realizado previamente o teste da MIC seguindo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI, (2012) com algumas modificações. Foram usadas as bactérias *C. perfringens* ATCC 12924, *S. aureus* ATCC 27659, *S. Typhimurium* ATCC 13311.

O teste foi realizado seguindo a técnica descrita por AIT SIDI BRAHIM et al., (2015) com algumas modificações. Para isso, uma combinação da benzofenona e o antimicrobiano convencional, foram utilizadas em diluições seriadas usando 2MIC de cada uma. Foram colocados 50 µL de bacitracina ao longo de cada poço das ordenadas da placa de microtitulação e as diluições da benzofenona foi disposta ao longo das abscissas (50 µL). Em seguida, foi adicionado (100 µL) a cada poço da suspensão da bactéria a avaliar (1x10⁴ UFC/ml), e incubou as placas a 37°C. 24 h (Figura 2). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

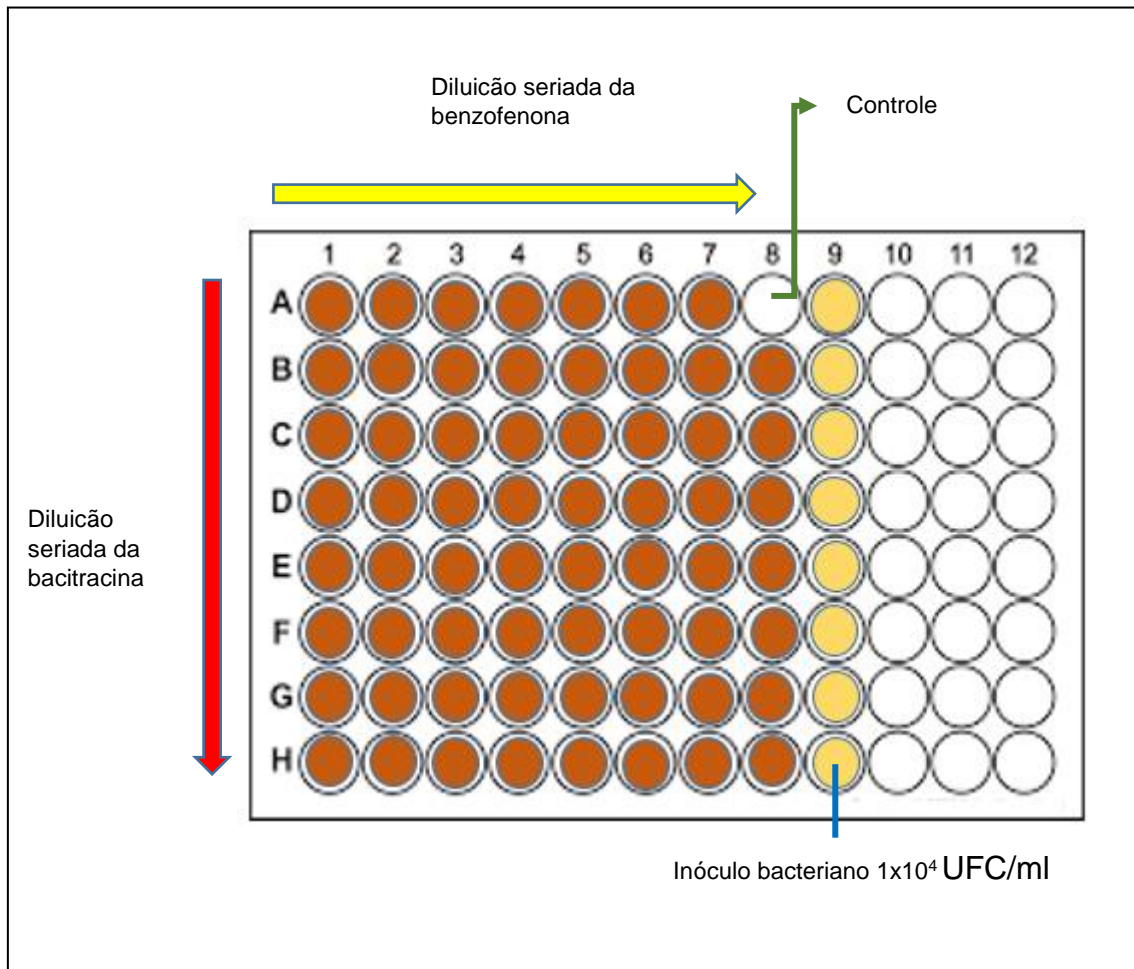


Figura 2 Esquema do método *checkerboard* para avaliação do efeito sinérgico da benzofenona com bacitracina frente ao inóculo bacteriano.

O resultado, foi avaliado algebricamente pelo índice de fração de concentração inibitória (FIC_i) de acordo com a seguinte equação:

$$FIC_i: \frac{MIC_{ab}}{MIC_a} + \frac{MIC_{ab}}{MIC_b}$$

MIC_a= MIC da benzofenona sozinha e MIC_{ab} é a MIC do composto a em combinação com o composto b.

Sinergismo total (FIC_i ≤ 0.5), sinergismo parcial (0.5 < FIC_i ≤ 0.75), nenhum efeito (0.75 < FIC_i ≤ 2) ou antagonismo (FIC_i > 2).

3.6 Ação da benzofenona na parede bacteriana

Para verificar a ação da benzofenona na parede bacteriana foram usadas as seguintes metodologias: liberação de proteína-Bradford, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão. E como modelo bacteriano foram usadas a bactéria de campo Gram-negativa *S. Typhimurium*, usando 2 mg/mL da benzofenona e a bactéria de campo Gram-positiva *S. aureus* empregando 1 mg/mL. Concentração de trabalho do inoculo bacteriano foi 1×10^8 UFC/mL.

3.6.1 Liberação de proteína-Bradford

Cada suspensão bacteriana foi tratada com a benzofenona durante 1 h, 2h e 3h. Depois centrifugada a 4 °C durante 30 min a 300 x g obtendo o sobrenadante onde foi avaliado a liberação de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) a uma D.O. de 595 nm. A determinação da concentração de proteína foi calculada com base na curva padrão realizada com albumina de soro bovina (BSA). Todos os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, com três repetições por experimento.

3.6.2 Citometria de fluxo

Para verificar se a benzofenona atua na permeabilidade da parede celular bacteriana, foi utilizada a citometria de fluxo para avaliar a curva de morte bacteriana. O protocolo foi realizada segundo CORONEL-LEÓN et al., (2016) com algumas modificações. O procedimento foi realizado adicionando 100 µL da solução da benzofenona e acrescido de 100 µL do inoculo da bactéria, e em seguida foram incubadas a 37°C durante 1 e 2 horas. Controle negativo foi o inóculo bacteriano sem adição da benzofenona. Posteriormente as amostras foram coradas com Iodeto de Propídio (IP) no escuro, e as leituras foram realizadas usando o citômetro de fluxo (BD FACS Verse), em um comprimento de onda de excitação de 488nm.

3.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para verificar as possíveis alterações na morfologia da parede bacteriana, após contato com a benzofenona foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, seguindo o protocolo realizado por NACIF-MARÇAL et al.,

(2015). Para isso, foi adicionado em um microtubo 50 μL da solução da benzofenona e 50 μL do inóculo bacteriano e depois incubado a 37°C durante 60, 120 e 180 min. O controle negativo foi o inóculo bacteriano sem adição da benzofenona. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas durante 10 min a 1400 x *g*, o *pellet* foi resuspendido com 50 μL de PBS. Sobre um *gride* foi colocado 7 μL da solução bacteriana adicionando uracila 2% por 15 seg, deixando secar por 24 horas. Posteriormente o resultado foi observado no microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109).

3.7 Análise estatístico.

Os resultados foram tabulados e analisados com o software estatístico SAS versão 9.3 (Statistical Analysis System 9.3, 2012, SAS Institute Inc.), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. Os dados foram analisados estatisticamente obtendo o valor médio e o desvio padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade antimicrobiana MIC e MBC

Os valores da MIC da benzofenona para as bactérias testadas variaram de 62.5 µg/mL até 250 µg/mL (Tabela 1). A análise estatística mostrou que não há diferença significativa ao usar a benzofenona contra as bactérias ATCC e bactérias isoladas de campo, considerando um valor de $p > 0,05$ (Figura 3).

Quando verificados os valores MBC, estes se encontraram aumentados duas vezes em relação aos valores correspondentes das MICs, variando de 125 até 500 µg/ mL (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (MIC) do composto 2,2',4-triidroxibenzofenona e bactérias ATCC e isolados de campo que afetam à avicultura e saúde pública.

Bactérias	Resultado ^a (µg/mL)	
	Benzofenona MIC	Benzofenona MBC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	125	250
<i>Escherichia coli</i> *	125	250
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Multocida</i> ATCC 6530.	62.5	125
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Multocida</i> *	62.5	125
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076.	250	500
Gram-negativa <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis*	250	500
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Gallinarum ATCC 9184.	125	250
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Pullorum ATCC 9120.	250	500
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 13311.	62.5	125
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium*	125	250
Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27659.	62.5	125
<i>Staphylococcus aureus</i> *	62.5	125
<i>Clostridium perfringens</i> , ATCC 12924.	125	250

^a Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC). Concentrações diferentes da benzofenona foram incubadas com 1×10^4 UFC / mL de cada estirpe bacteriana. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes ATCC: American type culture collection, fonte Fiocruz.

*: Bactérias isoladas de campo, fonte UFMG e Mercolab.

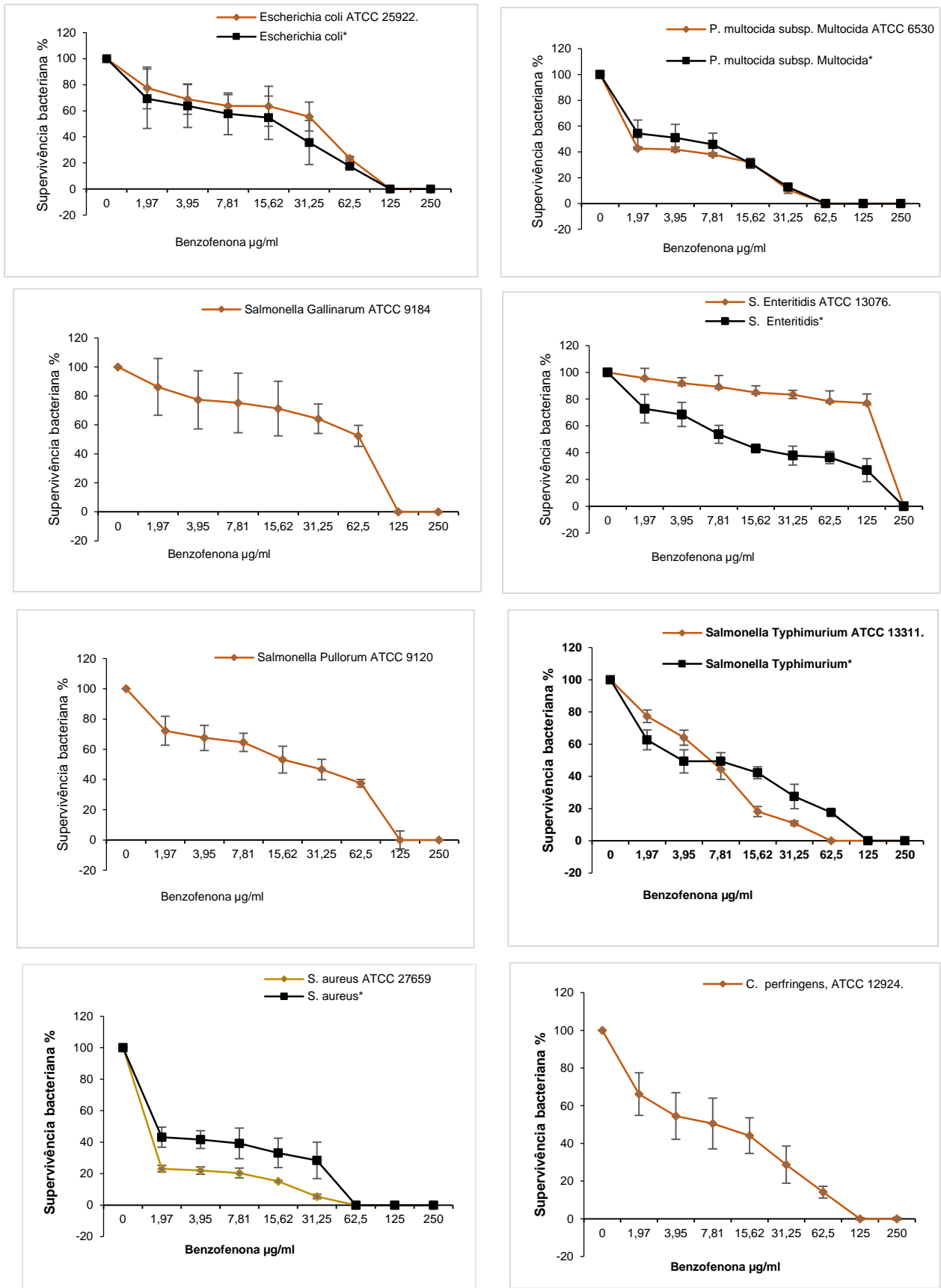


Figura 3 Atividade antimicrobiana do composto 2,2',4-triidroxibenzofenona em bactérias ATCC e isolados de campo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. Cada ponto representa o valor da média e o desvio padrão da média ($P > 0.05$) indicando que não houve diferença significativa.

4.2 Teste de hemólise

A Figura 4 apresenta a porcentagem de hemólise ocorrida quando na presença de diferentes concentrações da benzofenona, observando o tempo de incubação de duas horas da benzofenona e mesmo usando a maior concentração obtida na MIC (250 µg/mL), houve apenas 2.56% de hemólise em comparação ao controle positivo (Figura 4). O DMSO (concentração 5%) usado na diluição da benzofenona também foi avaliado não tendo atividade hemolítica.

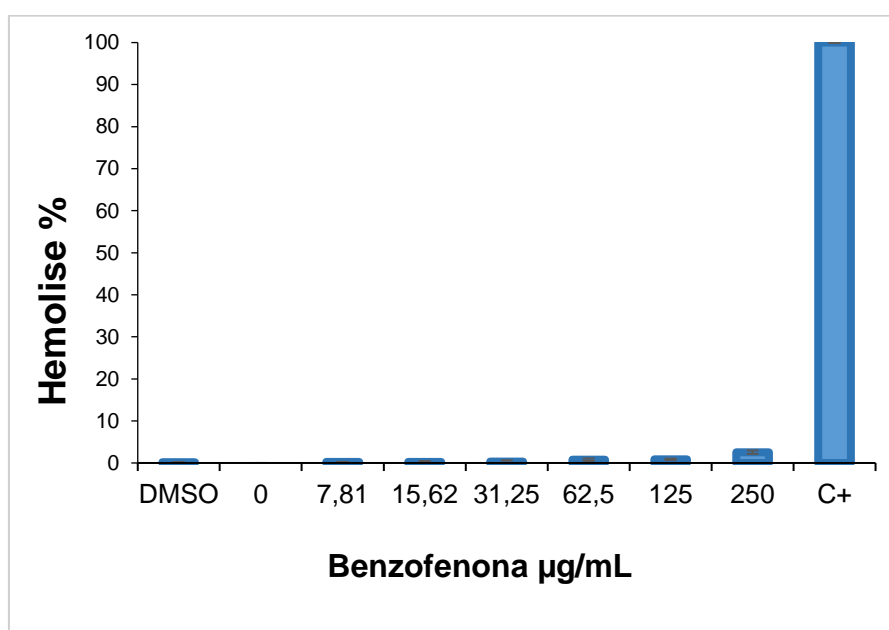


Figura 4 Atividade hemolítica de 2,2',4-triidroxibenzofenona em concentrações diferentes sobem os eritrócitos de galinha. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e três repetições, cada ponto representa o valor da média e o desvio padrão da média.

C+: 1% de Triton X-100. DMSO: Dimetilsulfóxido concentração 5%.

4.3 Método *checkerboard*

De acordo com os resultados das MICs apresentados na Tabela 2, verificou-se, que apenas a bacitracina apresentou a característica de baixa sensibilidade para a realização do método de *checkerboard*.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (MIC) de antimicrobianos usados no tratamento sob bactérias patogênicas de aves.

Bactéria	Agente	MIC (µg/mL)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 12924	Bacitracina	125
	Lincomicina	0.98
	Amoxicilina	15.62
	Eritromicina	3.95
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27659	Bacitracina	62.5
	Lincomicina	1.97
	Amoxicilina	0.98
	Eritromicina	0.49
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 13311	Lincomicina	1.97
	Amoxicilina	3.95
	Eritromicina	0.49

MIC: Determinação da concentração inibitória mínima
ATCC: American type culture collection, fonte Fiocruz.

O FIC_i mostrou que a benzofenona estudada apresentou um efeito sinérgico com a bacitracina de zinco contra a bactéria *C. perfringens*, ATCC 12924, mas em *S. aureus* ATCC 27659 não apresentou nenhum efeito (Tabela 3).

Tabela 3. Interações da benzofenona com a bacitracina em bactérias ATCC.

Bactérias	Agente	MIC ^a		FIC _i ^b	Efeito
		Sozinho	Associação		
<i>Clostridium perfringens</i> , ATCC 12924	Benzofenona Bacitracina	125/125	7.8/31.25	0.31	Sinergismo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27659	Benzofenona Bacitracina	62.5/62.5	7.8/62.5	1.12	Nenhum

ATCC: American type culture collection.

MIC: concentração inibitória mínima

^a MIC benzofenona e Bacitracina µg/mL.

^b Índice fracional de concentração inibitória (FIC_i).

4.4 Ação da benzofenona na parede bacteriana

4.4.1 Liberação de proteína

O extravasamento de proteínas a partir das bactérias tratadas com a benzofenona foi significativamente maior do que o grupo controle ($p < 0.05$). Foi verificada liberação de proteínas tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Figura 5).

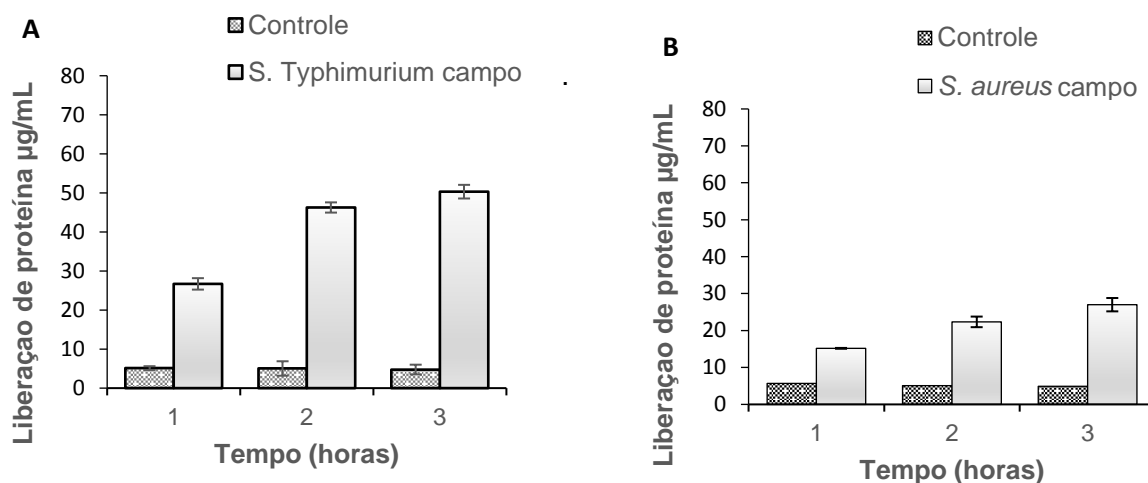


Figura 5 Efeito da 2,2',4-triidroxibenzofenona no extravasamento de proteínas de isolados bacterianos. Cada ponto representa o valor da média e o desvio padrão da média. A: benzofenona 2 mg/mL, B: benzofenona 1 mg/mL.

4.4.2 Citometria de fluxo

Foram observadas duas subpopulações de células bacterianas: uma subpopulação de células intactas e uma subpopulação, coradas com IP, indicando permeabilidade das células levando à morte destas.

A evolução da morte das bactérias é aumentada com o tempo de contato da benzofenona com as bactérias de campo atingindo um 45.1 % após 2 horas para *S. Typhimurium* (Figura 6) e 18.8% após 2 horas para *S. aureus* (Figura 7).

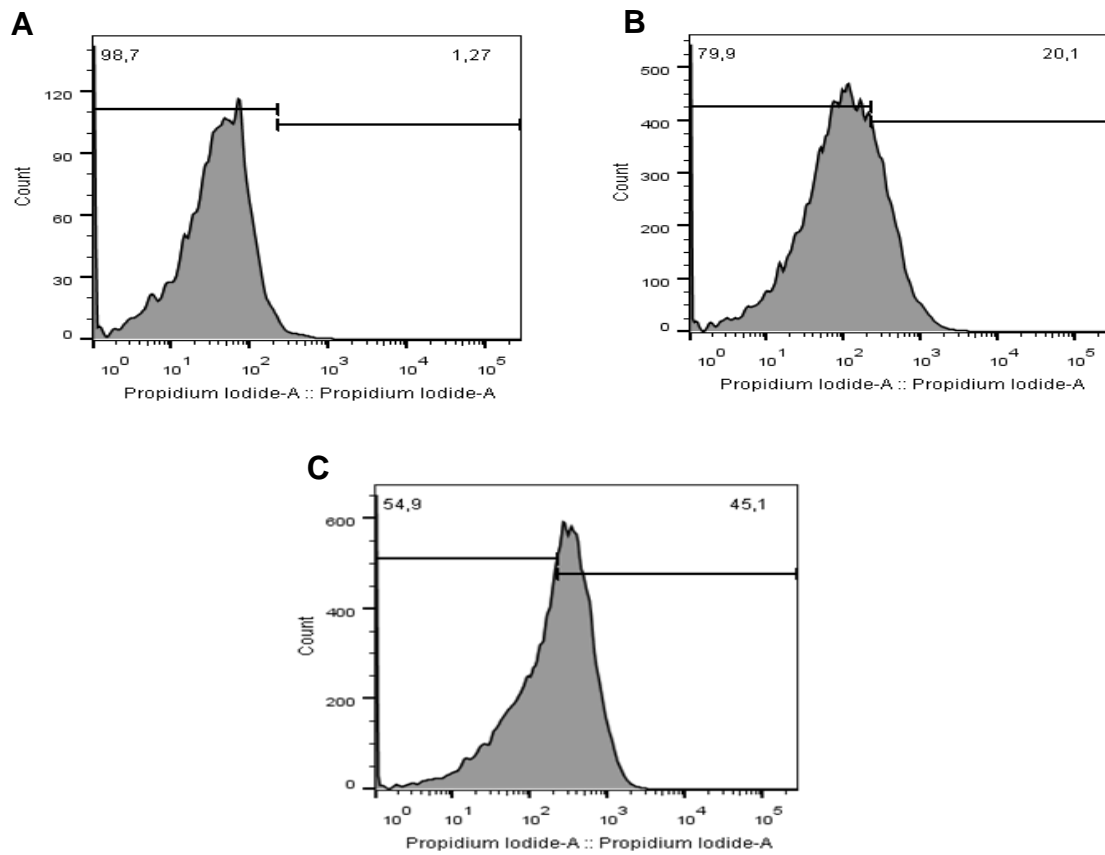


Figura 6 Subpopulações da bactéria de campo *S. Typhimurium* após o contato com a 2,2',4-triidroxibenzofenona (2 mg/mL) avaliadas no citrometro de fluxo. (A) sem benzofenona, (B) e (C) 1 hora, 2 horas após o tratamento. IP:iodeto de propídio

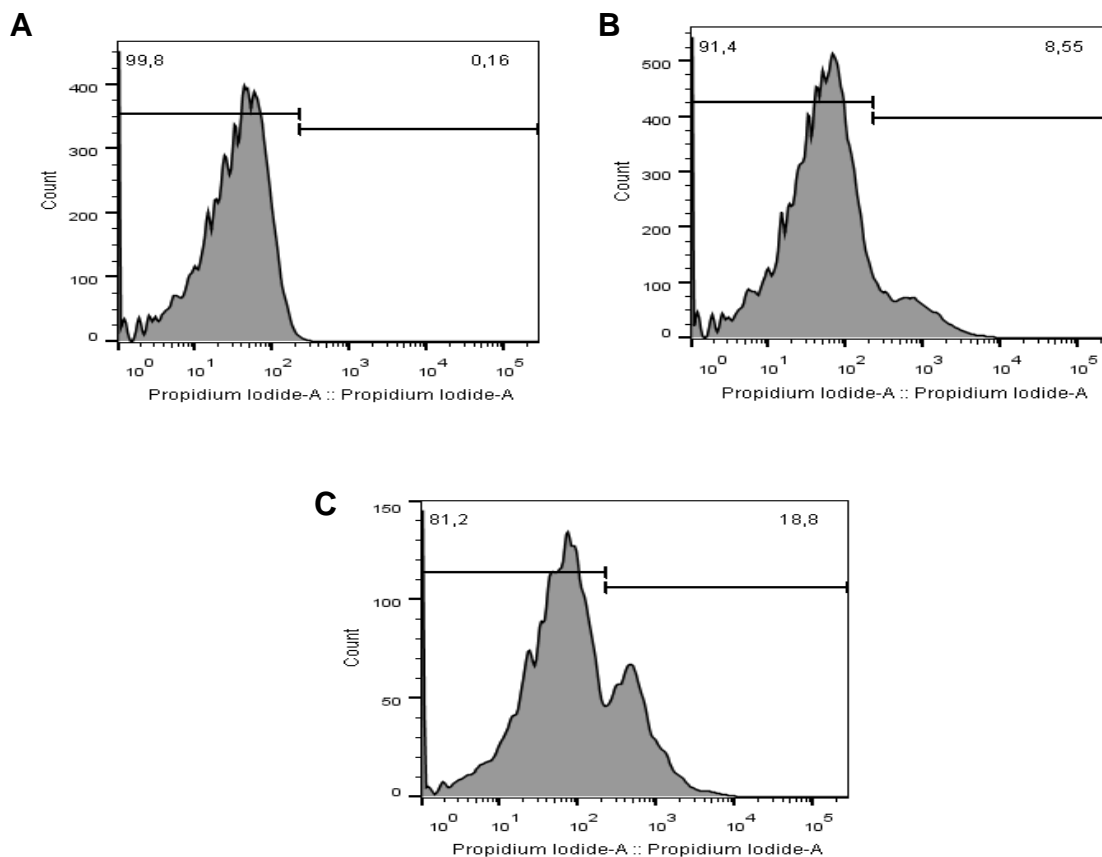


Figura 7 Subpopulações da bactéria de campo *S. aureus* após o contato com a 2,2',4-triidroxibenzofenona (1 mg/mL) avaliadas no citrometro de fluxo. (A) sem benzofenona, (B) e (C) 1 hora, 2 horas após o tratamento. IP:iodeto de propídio

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Quando foram expostas as bactérias à benzofenona durante 1 h, as alterações morfológicas foram evidentes, com pequenas rugas e a superfície exterior grossa e irregular (Figuras 8B e 9B). Quando o tempo de tratamento foi prolongado para 2h e 3 h, a morfologia da parede bacteriana foi severamente alterada, mostrando que o material citoplasmático foi extravasado para o meio extracelular (Figuras 8C, 8D, 9C e 9D). As figuras 8A e 9A mostram o controle.

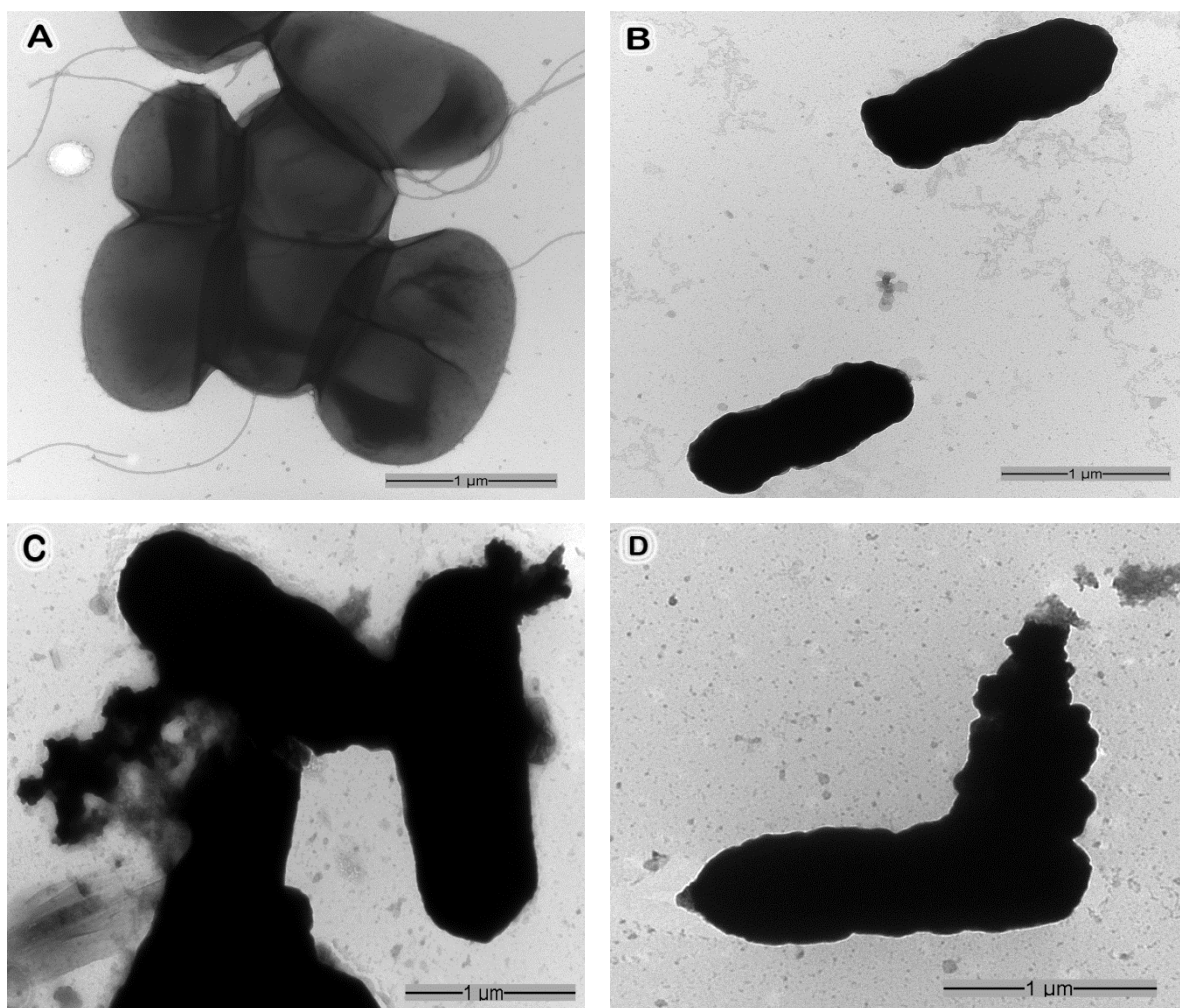


Figura 8 Resultado da presença da adição da 2,2',4-triidroxibenzofenona (2 mg/mL) em cultura *S. Typhimurium* isolado de campo utilizando microscopia electrónica de transmissão. (A) sem benzofenona, (B), (C) e (D) 1 hora, 2 horas e 3 horas após o tratamento respectivamente. Escala de barra é de 1 µm.

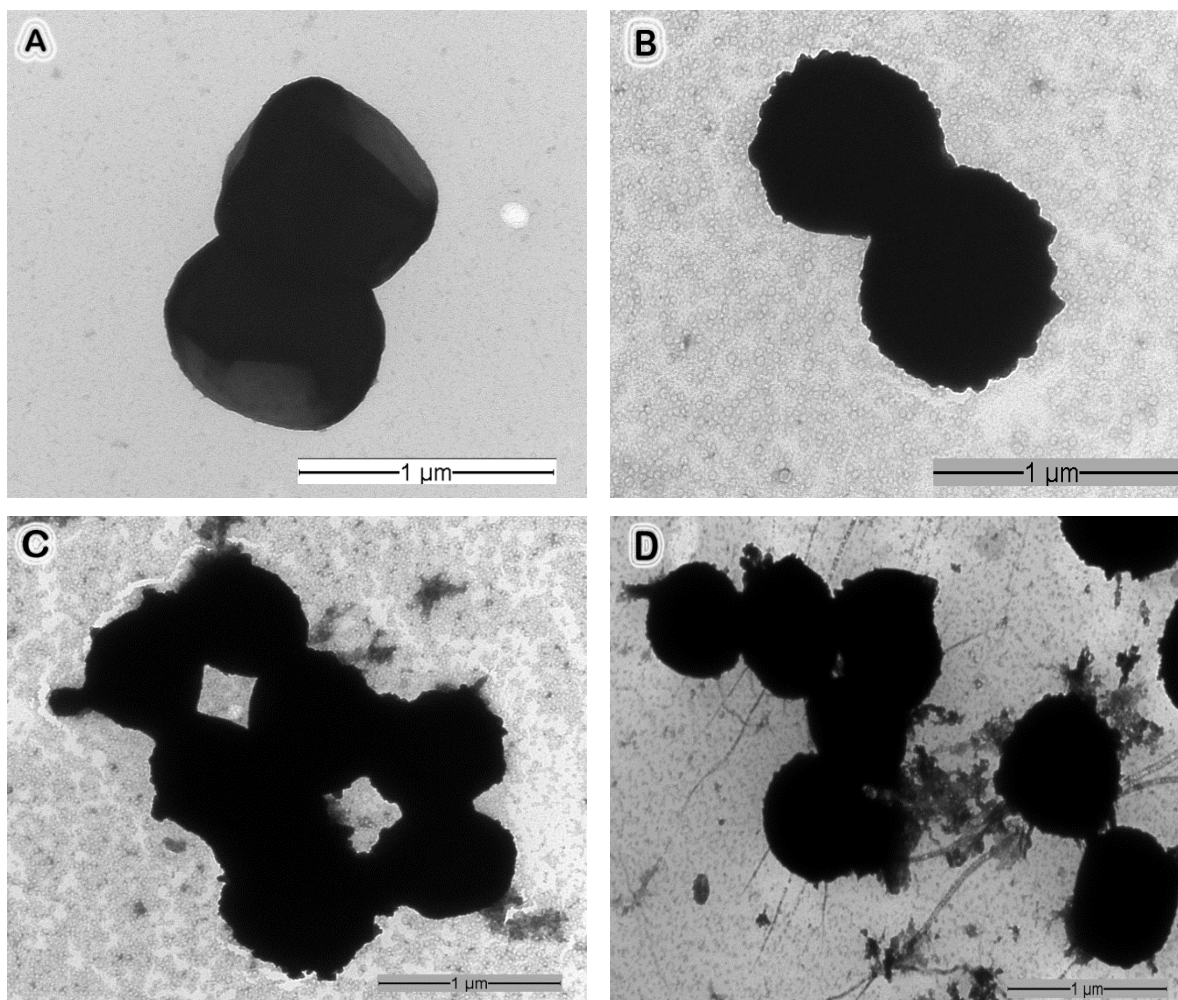


Figura 9 Resultado da presença da adição da 2,2',4-triidroxibenzofenona (1 mg/mL) em cultura *S. aureus* isolado de campo utilizando microscopia electrónica de transmissão. (A) sem benzofenona, (B), (C) e (D) 1 hora, 2 horas e 3 horas após o tratamento respectivamente. Escala de barra é de 1 µm.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da MIC e MBC, pode-se verificar que o composto 2,2',4-triidroxibenzofenona possui atividade antimicrobiana contra as cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Este antimicrobiano demonstrou similar efeito tanto em bactérias ATCC como em bactérias que foram isoladas de campo a partir de amostras aviárias. Com respeito aos isolados de campo, as pressões seletivas resultantes da administração inadequada de moléculas antimicrobianas vêm resultando em bactérias resistentes como: *E. coli*, *Salmonella*, *P. multocida*, *C. perfringens*, e *S. aureus* (OSMAN; ELHARIRI, 2013, VOSSENKUHL et al., 2014, KHAN et al., 2015, TU et al., 2015, WU et al., 2015, BOULIANNE et al., 2016, CUI et al., 2016, FURIAN et al., 2016, HASSAN et al., 2016, , VICTOR et al., 2016), o que outorga um lugar de destaque à benzofenona estudada, posicionando-a como um candidato promissor para os esquemas de intervenção sanitária nas aves afetadas pelas cepas de bactérias testadas.

Quando analisada a citotoxicidade, foi identificada uma baixa atividade hemolítica, sugerindo a ausência de toxicidade para células animais, o que confere confiabilidade à benzofenona para ser testada em campo. MA et al., (2013) e YACOUB et al., (2016) também utilizaram hemácias de galinha para avaliar a citotoxicidade de peptídeos antimicrobianos. A interação homeostática da benzofenona avaliada com as células animais também sugere a possibilidade de desenhar mecanismos de disponibilidade farmacêutica para animais de produção tanto pela água de bebida assim como no alimento balanceado, como já foi utilizado segundo DORIGUETTO et al., (2007) avaliando este derivado da benzofenona como anti-inflamatório pela via oral em camundongos. As propriedades farmacocinéticas da 2,2',4-triidroxibenzofenona relativas à absorção e permeabilidade estimadas a partir da aplicação da regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001), sugerem que a referida benzofenona apresenta características físico-químicas apropriadas a uma boa biodisponibilidade por via oral, mostrando ser um bom candidato a fármaco e garantindo a sua administração pela via oral. Essa via é a mais utilizada pois permite o oferecimento da droga a um grande número de aves ao mesmo tempo, além do baixo custo (LANDONI; ALBARELLOS, 2015).

Existem derivados naturais da benzofenona com atividade antimicrobiana, mas não existe certeza com respeito ao mecanismo de ação (NALDONI et al., 2009, DE CASTRO ISHIDA et al., 2011, SAKUNPAK et al., 2012). No entanto, a pesquisa conduzida por (VOOTURI et al., 2009) quando empregaram a benzofenona contendo agentes ligantes de DNA, esta exibiu atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram negativas, sendo o local de ação a parede bacteriana, resultando em despolarização.

Neste estudo, o efeito da benzofenona na parede bacteriana foi verificado por três metodologias nas bactérias *S. Typhimurium* e *S. aureus*. Na citometria de fluxo, foi avaliada a permeabilidade da parede bacteriana, observando um efeito de tempo dependente ao entrar em contato a bactéria Gram-negativa com a benzofenona, sugerindo que a composição fina de peptidoglicanos na parede da bactéria Gram-negativa, tenha influenciado uma ação mais rápida em comparação com a composição espessa de peptidoglicanos da parede da bactéria Gram-positiva (YOUNT; YEAMAN, 2013). Pelo método BRADFORD, (1976) foi identificado que tanto *S. Typhimurium* quanto *S. aureus* ao entrar em contato com a benzofenona, ocorria extravasamento dos componentes intracelulares. Sugerindo possuir similares mecanismos de transporte transmembrana resultando na formação de poros na parede bacteriana, que aumentariam a permeabilidade incrementando a pressão hipotônica no interior das bactérias (BORIS et al. 2008), o que secundariamente induziria alterações no citoesqueleto das bactérias, outorgando uma aparência pleomórfica e comprometendo finalmente a integridade confirmada pela microscopia eletrônica de transmissão (Fig 8B e Fig 9B) (SHIH; ROTHFIELD, 2006). As figuras 8C, 8D, 9C e 9D observadas no microscópio eletrônico de transmissão, confirmam o resultado de extravasamento de proteínas no teste de Bradford e permeabilidade das bactérias na citometria de fluxo.

Segundo SAKAGAMI et al., (2013), as xantonas, um derivado natural da benzofenona em combinação com grupos hidroxila, evidenciaram atividade antibacteriana elevada, cujo efeito pode se relacionar com a benzofenona em este estudo devido à presença de três grupos hidroxilo. Igualmente 2,2',4-

triidroxibenzofenona, é uma molécula moderadamente lipofílica que ao conter vários grupos -OH tornando-se mais hidrofílica. O que pode se relacionar com as porções hidrofílicas dos peptídeos antimicrobianos resultando na formação de poros (BAHAR; REN, 2013).

Mesmo que neste estudo foram empregadas as bactérias *S. Typhimurium* e *S.aureus* como modelo para verificar a ação da benzofenona na parede bacteriana pelas técnicas de Bradford, citometria de fluxo, e microscopia eletrônica de transmissão, esses microrganismos foram escolhidos com base no enorme impacto sobre a saúde humana e animal, assim como pelas perdas econômicas induzidas por ambos agentes (PETON; LE LOIR, 2014) (AILES et al., 2013). *S. Typhimurium* foi o agente etiológico mais isolado em casos de salmonelose humana na Europa (EFSA/ECDC, 2013), sendo que as aves foram consideradas como um importante reservatório (MUGHINI-GRAS et al., 2014), (LÖFSTRÖM et al., 2015). *S. Typhimurium* foi associado com múltiplos surtos de origem alimentar na Austrália, que epidemiologicamente estiveram ligados ao consumo de ovos (MCWHORTER et al., 2015), (MUSTO et al., 2016) ou frango (FEARNLEY et al., 2011). *S. aureus*, foi um dos principais patógeno humano isolado na infecção nosocomial e contagiosa (TONG et al., 2015). Sendo que *S. aureus* também se posicionou como uma das principais entidades que causaram doenças em animais, incluindo afecções no esqueleto das aves (MCNAMEE; SMYTH, 2000). Em um estudo realizado por LOWDER et al., (2009), *S. aureus* isolado de aves foi filogeneticamente idêntico ao agente isolado de humanos, chamando a atenção da transmissão desta bactéria dentre humanos e aves. Além da resistência antimicrobiana citada por vários autores (NEMEGHAIRE et al., 2013), (VOSENKUHL et al., 2014), (KRAUSHAAR et al., 2016).

C. perfringens causa a enterite necrótica que é uma doença de importância crescente para a indústria de aves, originando um custo total em surtos no mundo em mais de US \$ 6 bilhões por ano (WADE; KEYBURN, 2015). Bacitracina é um dos agentes antimicrobianos mais usados para controlar esta doença (BRENNAN et al., 2003) além de ser usado como melhorador de desempenho (REIS et al., 2014), (BORTOLUZZI et al., 2015) . Em nosso estudo a combinação da benzofenona com a bacitracina apresentou efeito sinérgico reduzindo os valores da MIC 4 vezes (1/4 MIC), para *C. perfringens* ATCC

12924. A bacitracina interfere com a desfosforilação do C₅₅-pirofosfato de isoprenilo , uma molécula que transporta os elementos estruturais dos peptidoglicanos na parede celular bacteriana (STONE; STROMINGER, 1971), sugere-se que a referida benzofenona atua em outro local da parede bacteriana resultando na potencialização do efeito antimicrobiano.

No Brasil, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento é permitido e feito dentro de normas estipuladas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2004), no caso da bacitracina de zinco o nível máximo para ser utilizado em frangos de corte é 50 ppm o que indica-se que o resultado de nossa pesquisa do sinergismo da benzofenona com a bacitracina diminui o limite máximo sugerido pelo MAPA o que pode-se indicar que além de ser um candidato para o tratamento de enterite necrótica em aves, também pode ser usado como promotor de crescimento. Assim, poderia ser uma alternativa para diminuir a dose da bacitracina, diminuindo os efeitos secundários e o aparecimento de resistência, como foi relatado pelos autores SILVA et al., (2009), CHARLEBOIS et al., (2012), HAN et al., (2015), além de evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada em humanos, como relatada em vários países da Europa levando à proibição no uso dos promotores de crescimento (CASEWELL et al., 2003) (ALLOUI et al., 2013).

No presente trabalho, a atividade sinérgica da benzofenona com a bacitracina foi relatada pela primeira vez.

O composto sintético 2,2',4-triidroxibenzofenona, possui várias aplicações biológicas, como anti-inflamatório e antioxidante (DORIGUETTO et al., 2007), mas este é o primeiro relato contra bactérias que causam grandes prejuízos na produção avícola e saúde pública . A benzofenona pode ser sintetizado em grande escala, com uma ótima relação custo-benefício, o que pode favorecer sua produção e garantir seu efeito em comparação a compostos naturais antimicrobianos, tradicionalmente usados.

6. CONCLUSÕES

- O composto 2,2',4-triidroxibenzofenona possui atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizados neste estudo;
- Não induz efeitos tóxico em células animais;
- Conclui-se segundo a regra Lipinski que a referida benzofenona apresenta características físico-químicas apropriadas a uma boa biodisponibilidade por via oral podendo resultar no desenvolvimento de um medicamento;
- O provável sitio de ação da benzofenona é a parede celular bacteriana;
- A benzofenona tem efeito sinérgico com bacitracina.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AARTS, H. J. M. et al. A multiplex ligation detection assay for the characterization of Salmonella enterica strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. SUPPL. 1, p. S68–S78, 2011.

ABPA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2015**. [s.l: s.n.].

AILES, E. et al. Economic and Health Impacts Associated with a Salmonella Typhimurium Drinking Water Outbreak-Alamosa, CO, 2008. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.

AIT SIDI BRAHIM, M. et al. Chenopodium ambrosioides var. ambrosioides used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 37–43, 2015.

ALLOUI, M. N.; SZCZUREK, W.; SCIENCE, F. The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: a review. **Annals of Animal Science**, v. 13, n. 1, p. 17–32, 2013.

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens Bacillus cereus and Clostridium perfringens? **International journal of food microbiology**, v. 28, n. 1419, p. 145–155, 1995.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.

BARROW, P. A; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. **Avian pathology**, v. 40, n. 1, p. 1–13, 2011.

BORIS MARTINAC, YOSHIRO SAIMI, A. C. K. Ion channels in disease. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 88, n. 2, p. 1449–1490, 2008.

BORTOLUZZI, C. et al. Hops β -acids and zinc bacitracin affect the performance and intestinal microbiota of broilers challenged with Eimeria acervulina and Eimeria tenella. **Animal Feed Science and Technology**, v. 207, p. 181–189, 2015.

BOULIANNE, M. et al. Drug use and antimicrobial resistance among escherichia coli and enterococcus spp. Isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 49–59, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BRENNAN, J. et al. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. **Poult Science**, v. 82, n. 3, p. 360–363, 2003.

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. Clostridium perfringens and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 195–202, 2002.

CASEWELL, M. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 159–161, 2003.

CASTANON, J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466–2471, 2007.

CASTRO, M. L. et al. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 9, p. 25, 2009.

CHARLEBOIS, A. et al. Characterization of Genes Encoding for Acquired Bacitracin Resistance in Clostridium perfringens. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

CHOMEL, B. B.; SUN, B. Zoonoses in the bedroom. p. 26–31, 2011.

CLSI CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. v. 32, n. 9, p. 18, 2012.

COLLIGNON, P. Superbugs in food: A severe public health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 8, p. 641–643, 2013.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by Clostridium perfringens type A. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 55–60, 2009.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 25, n. 3, p. 314–27, 2013.

CORONEL-LEÓN, J. et al. Assessment of antimicrobial activity of N -lauroyl arginate ethylester (LAE) against Yersinia enterocolitica and Lactobacillus plantarum by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Food Control**, v. 63, p. 1–10, 2016.

CRAVEN, S. E. et al. Incidence of Clostridium perfringens in Broiler Chickens and Their Environment during Production and Processing. **Avian Diseases**, v. 45, n. 4, p. 887–896, 2001.

CUESTA et al. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1013–1015, 1999.

CUETO, M. et al. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1444–1446, 2001.

CUI, M. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from an integrated broiler chicken supply chain in Qingdao, China. **Food Control**, v. 62, p. 270–276, 2016.

DAHIYA, J. P. et al. Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* populations in broiler chickens¹. **Poultry Science**, v. 84, n. 12, p. 1875–1885, 2005.

DE ALMEIDA, L. et al. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against *Leishmania(L.) amazonensis* amastigotes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 75, p. 93–99, 2015.

DE CASTRO ISHIDA, V. F. et al. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 966–972, 2011.

DHANOVA, A.; FATT, Q. K. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: Epidemiology, clinical characteristics and its' association with severe immunosuppression. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, p. 15, 2009.

DHEILLY, A. et al. Antimicrobial resistance selection in avian pathogenic *E. coli* during treatment. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 655–658, 2013.

DORIGUETTO, A.C.FELIPE T. MARTINSA), JAVIER ELLENAB), ROGE´RIO SALLOUMB), MARCELO H. DOS SANTOSC), MARIA E. C. MOREIRAD), JOSE´ M. SCHNEEDORFC), AND T. J. N.; A). 2,2',4-Trihydroxybenzophenone: Crystal Structure, and Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**, v. 4, p. 488–499, 2007.

DOS SANTOS, M. H. et al. **7-epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rhedia gardneriana*** *Quimica Nova*, 1999.

DOU, X. et al. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. **Gene**, 2015.

DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian pathology**, v. 37, n. 4, p. 355–66, 2008.

EFSA/ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of zoonotic agents and food borne Outbreaks in 2011. v. 11, n. 4, p. 3129–3250, 2013.

FALLAVENA, L. C. et al. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses - a microscopic and macroscopic study. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 29, n. 6, p. 557–562, 2000.

FEARNLEY, E. et al. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 219–227, 2011.

FURIAN, T. Q. et al. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 210–216, 2016.

GAL-MOR, O.; BOYLE, E. C.; GRASSL, G. A. Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. AUG, p. 1–10, 2014.

GRIFFIN, P. M.; MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of escherichia coli causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 712–719, 2012.

GUILBART, M. et al. Fatal multifocal *Pasteurella multocida* infection: a case report. **BMC research notes**, v. 8, p. 287, 2015.

GUO, C. et al. Application of Bayesian techniques to model the burden of human salmonellosis attributable to U.S. food commodities at the point of processing: adaptation of a Danish model. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 4, p. 509–16, 2011.

GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 149–158, 2008.

HAFEZ, H. M. Pakistan Veterinary Journal. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 8318, n. 2, p. 85–92, 2011.

HAN, X. et al. Functional analysis of a bacitracin resistant determinant located on ICE *Cp1*, a novel Tn 916-like element from a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. August, p. AAC.01643–15, 2015.

HASSAN, A.-R. H. A.; SALAM, H. S. H.; ABDEL-LATEF, G. K. Serological identification and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broiler carcasses and human stools in Beni-Suef, Egypt. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, p. 0–5, 2016.

HEIKINHEIMO, A. et al. Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1724–1729, 2006.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 8, p. 887–900, 2011.

HEYDEMANN, J.; HEYDEMANN, J. S.; ANTONY, S. Acute infection of a total knee arthroplasty caused by *Pasteurella multocida*: A case report and a comprehensive review of the literature in the last 10 years. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. SUPPL. 3, p. e242–e245, 2010.

JOHNSON, T. J. et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3228–3236, 2007.

JOHNSON, T. J. et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7043–7050, 2008.

KEHRENBERG, C. et al. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: Epidemiology and genetic basis. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3–4, p. 323–339, 2001.

- KHAN, M. et al. Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from mutton, beef and chicken meat. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 5323–5328, 2015.
- KHANUM, S. A. et al. Synthesis and evaluation of benzophenone-n-ethyl morpholine ethers as anti-inflammatory agents. **International Journal of Biomedical Science**, v. 6, n. 1, p. 60–65, 2010.
- KITAI, S. et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 67, n. 3, p. 269–74, 2005.
- KRAUSHAAR, B. et al. Antimicrobial resistances and virulence markers in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from broiler and turkey: A molecular view from farm to fork. **Veterinary Microbiology**, 2016.
- KUMAR, A. A. et al. Prevalent serotypes of *Pasteurella multocida* isolated from different animal and avian species in India. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 8, p. 657–667, 2004.
- LAKSHMI RANGANATHA, V. et al. Design, Synthesis, and Anticancer Properties of Novel Benzophenone-Conjugated Coumarin Analogs. **Archiv der Pharmazie**, v. 346, n. 12, p. 901–911, 2013.
- LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 21–7, 2015.
- LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, 2001.
- LÖFSTRÖM, C. et al. Outbreak of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT41 in Danish poultry production. **Veterinary Microbiology**, v. 178, p. 167–172, 2015.
- LOWDER, B. V et al. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 106, n. 1091-6490 (Electronic), p. 19545–19550, 2009.
- LOWY, F. D. the chromosome, as well as the extrachromosomal elements. 6 These genes are transferred between staphylococcal strains, species, or other gram-positive bacterial species through the extrachromosomal elements. 7. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.
- MA, D. et al. Identification of three novel avian beta-defensins from goose and their significance in the pathogenesis of *Salmonella*. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 4, p. 521–529, 2013.
- MACIEL-REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3114–3119, 2013.
- MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882–889, 2010.

MAPA MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
Relatório Técnico. [s.l: s.n.].

MCNAMEE, P. T.; SMYTH, J. A. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. **Avian Pathology**, v. 29, n. 5, p. 477–495, 2000.

MCWHORTER, A. R.; DAVOS, D.; CHOUSALKAR, K. K. Pathogenicity of Salmonella strains isolated from egg shells and the layer farm environment in Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 405–414, 2015.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic Escherichia coli: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916–32, 2013.

MORA, A. et al. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among escherichia coli poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 6991–6997, 2010.

MOULIN-SCHOULEUR, M. et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 Escherichia coli isolates of human and avian origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3484–3492, 2006.

MUGHINI-GRAS, L. et al. Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: A combined case-control and source attribution analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

MUSTO, J. et al. Original Article. **Foodborne Pathogens and Disease**, p. 1–7, 2016.

NACIF-MARÇAL, L. et al. Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). **Toxicon**, v. 99, p. 16–22, 2015.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 2, p. 403–407, 2009.

NEMEGHAIRE, S. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from healthy carrier chickens. **Avian pathology**, v. 42, n. March 2015, p. 342–6, 2013.

NIEWOLD, T. A. The Nonantibiotic Anti-Inflammatory Effect of Antimicrobial Growth Promoters, the Real Mode of Action? A Hypothesis. **Poultry Science**, v. 86, p. 605–609, 2007.

OSMAN, K. M.; ELHARIRI, M. Antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* isolates from broiler chickens in Egypt. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz**, v. 32, n. 3, p. 841–850, 2013.

PALLET, A.; HAND, K. Complicated urinary tract infections: Practical solutions for the treatment of multiresistant gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. SUPPL. 3, 2010.

PENNINGTON, H. Escherichia coli O157. **The Lancet**, v. 376, n. 9750, p. 1428–1435, 2010.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. Clostridium perfringens: Toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 104–110, 1999.

PETON, V.; LE LOIR, Y. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, n. August, p. 602–615, 2014.

REIS, M. DE P. et al. Níveis da bacitracina de zinco como melhorador do desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1093–1099, 2014.

SAKAGAMI, Y. et al. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters Antibacterial activity of xanthenes from Garcinia mangostana (L .) and their structure – activity relationship studies. **Natural Product Research**, v. 27, n. 10, p. 938–941, 2013.

SAKUNPAK, A.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 826–831, 2012.

SANG, S. et al. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: Analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. **Tetrahedron**, v. 58, n. 51, p. 10095–10102, 2002.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SCHOENI, J. L.; DOYLE, M. P. Variable Colonization of Chickens Perorally Inoculated with Escherichia coli 0157 : H7 and Subsequent Contamination of Eggs. v. 60, n. 8, p. 2958–2962, 1994.

SCHOULER, C. et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic Escherichia coli based on four patterns of virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1673–1678, 2012.

SHIH, Y.-L.; ROTHFIELD, L. The Bacterial Cytoskeleton. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 3, p. 729–754, 2006.

SHIVACHANDRA, S. B. et al. Identification of avian strains of Pasteurella multocida in India by conventional and PCR assays. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 3, p. 561–564, 2006.

SILVA, R. O. S. et al. Antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens strains isolated from broiler chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 262–4, 2009.

SONGER, J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 399–404, 2010.

STONE, K. J.; STROMINGER, J. L. Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55-Isoprenyl Pyrophosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 12, p. 3223–3227, 1971.

- TIMBERMONT, L. et al. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian pathology**, v. 40, n. 4, p. 341–7, 2011.
- TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.
- TU, L. T. P. et al. High levels of contamination and antimicrobial-resistant non-typhoidal Salmonella serovars on pig and poultry farms in the Mekong Delta of Vietnam. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 14, p. 3074–3086, 2015.
- TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals - Prejudices, perceptions and realities. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 26–27, 2004.
- VAN IMMERSEEL, F. et al. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32–36, 2009.
- VICTOR, A. et al. Prevalence and antibiotic resistance of Pasteurella multocida isolated from chicken in Ado-Ekiti metropolis. **International Journal of Scientific World**, v. 4, n. 2, p. 40, 2016.
- VOOTURI, S. K. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of benzophenone-based tetraamides as novel antibacterial agents. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 16, p. 5020–5031, 2009.
- VOSENKUHL, B. et al. Comparison of spa Types, SCCmec types and antimicrobial resistance profiles of MRSA isolated from Turkeys at farm, slaughter and from retail meat indicates transmission along the production chain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.
- WERTHEIM, H. F. et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.
- WU, X. DE et al. Benzophenone glycosides and epicatechin derivatives from Malaria oleifera. **Fitoterapia**, v. 83, n. 6, p. 1068–1071, 2012.
- WU, H. et al. Identification of integrons and phylogenetic groups of drug-resistant Escherichia coli from broiler carcasses in China. **International journal of food microbiology**, v. 211, n. July, p. 51–6, 2015.
- YACOUB, H. A. et al. Antimicrobial activities of chicken beta-defensin (4 and 10) peptides against pathogenic bacteria and fungi. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, n. April, p. 36, 2015.
- YACOUB, H. A. et al. Biocidal activity of chicken defensin-9 against microbial pathogens. **Biochem. Cell Biol.**, v. 94, p. 1–12, 2016.
- YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: Cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 127–138, 2013.
- ZABIULLA et al. Design and synthesis of diamide-coupled benzophenones as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 115, p. 342–351, 2016.

8. ANEXOS

ANEXO I

Identificação e origem dos isolados bacterianos utilizados.

BACTÉRIAS	ORIGEM DOS ISOLADOS		
	ATCC (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ – Brasil.)	Isolado de Campo (UFMG, Belo Horizonte - MG – Brasil.)	Isolado de campo (Mercolab Cascavel – PR–Brasil.)
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12924.		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922.	X	
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	ATCC 6530.		X
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	ATCC 13076.		X
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Gallinarum	ATCC 9184.		
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Pullorum	ATCC 9120.		
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	ATCC 13311.		X
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27659.	X	X

UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais.

ANEXO II Protocolo nº:47/2015 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFV.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 47/2015, intitulado "Avaliação do potencial antimicrobiano das benzofenonas sintéticas na avicultura", coordenado pela professora Maria A. Scatamburlo Moreira do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 06/10/2015, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 47/2015, named "Potential antimicrobial evaluation of synthetic benzophenones in poultry", is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on October 06, 2015 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV