

UNIVERSIDADE BRASIL  
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Campus Descalvado

PRISCILA E. ROSIQUE

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA DE  
ÁCIDOS ORGÂNICOS, ASSOCIADOS OU NÃO, FRENTE À  
*Escherichia coli* E *Salmonella spp*

INHIBITORY CONCENTRATION AND MINIMUM BACTERICIDE OF  
ORGANIC ACIDS, ASSOCIATED OR NOT, AGAINST  
*Escherichia coli* E *Salmonella spp*

Descalvado, São Paulo

2019

Priscila E. Rosique

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA DE  
ÁCIDOS ORGÂNICOS, ASSOCIADOS OU NÃO, FRENTE À  
*Escherichia coli* E *Salmonella spp*

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Produção Animal da UNIVERSIDADE BRASIL, como complementação dos  
créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção  
Animal.

Descalvado, São Paulo

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rosique, Priscila E.

R731c      Concentração inibitória e bactericida mínima de ácidos orgânicos, associados ou não, frente à *Escherichia coli* e *Salmonella spp* / Priscila E. Rosique. -- Descalvado, 2019.  
38f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian

1. Diarreia em bezerros. 2. Ácido Benzoico. 3. Ácido fumárico. 4. Ácido fórmico. 5. Acácia Negra. 6. Castanha portuguesa. I. Título.

CDD 636.208963427

**Termo de Autorização**

**Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do  
Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES**

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://universidadebrasil.edu.br/portal/cursos/ppgpa/>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

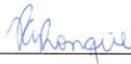
A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, ASSOCIADOS OU NÃO COM EXTRATO DE PLANTAS, FRENTE À *Escherichia coli* E *Salmonella spp*".

Autor(es):

Discente: Priscila Estela Rosique Joppert

Assinatura: \_\_\_\_\_



Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian

Assinatura: \_\_\_\_\_



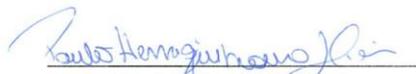
Data: 29 de março de 2019

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**Priscila Estela Rosique Joppert**

**“CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA DE  
ÁCIDOS ORGÂNICOS, ASSOCIADOS OU NÃO COM EXTRATO DE  
PLANTAS, FRENTE À *Escherichia coli* E *Salmonella spp*”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian  
(Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Profa. Dra. Kathery Brennecke  
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Dra. Luriany Pompeo Ferraz  
Orgolabs - Laboratórios

Descalvado, 29 de março de 2019

**Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian**  
Presidente da Banca

Ao esposo e filho.

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, Senhor de tudo e de todos. Obrigada pela saúde e força para realizar todas as etapas desse curso.

À família, pelo incentivo em todos os momentos.

Aos colegas de turma, pela companhia nesses anos de curso.

Ao meu orientador, pela ajuda inestimável.

À Profa Dora Inés Kozusny-Andreani, pelas análises laboratoriais que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

*Judo posso naquele que me fortalece.*

*Fl. 4:13*

# CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, ASSOCIADOS OU NÃO, FRENTE À *Escherichia coli* E *Salmonella spp*

## RESUMO

Os ácidos orgânicos e alguns extratos herbais apresentam efeito antimicrobiano, sendo assim podem possuir controle na *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. São os principais causadores da síndrome da diarreia em bezerros jovens e importante causa de morbidade e mortalidade, resultando em perdas econômicas consideráveis aos pecuaristas. Nesta casuística, vários enteropatógenos podem estar envolvidos, isoladamente ou em associação, sendo a *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, dois dos principais agentes causadores desta síndrome. Nesse sentido, os ácidos orgânicos e alguns extratos herbais podem ser uma alternativa no controle da diarreia em bezerros neonatos, uma vez que apresentam efeito antimicrobiano. Porém, os ácidos e sais orgânicos são populares e muito bem documentados na produção de suínos e aves, mas informações sobre os eventuais efeitos destes compostos no controle de diarreia em bezerros são ainda desconhecidas. Este estudo visou determinar a atividade antimicrobiana de uma mistura de ácidos orgânicos, associados ou não com extrato herbal, no controle *in vitro* de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, agentes causadores de diarreia em bezerros lactentes. Para o estudo, foram utilizadas as linhagens padrões: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi CCCD S003, sendo reativadas em meio agarizado de Tayer e incubadas por 24 horas a 37 ° C. O blend de ácidos orgânicos foi composto por 25% de ácido benzoico, 30% de ácido fórmico, 25% de ácido fumárico e 20% de dióxido de sílica. Já o blend de ácidos orgânicos associado ao extrato vegetal foi composto por 21,2% de ácido benzoico, 25,5% de ácido fórmico, 21,2% de ácido fumárico, 17,1% de dióxido de sílica e 15% de extrato vegetal. Por sua vez, o extrato de plantas foi composto por 50% de castanha portuguesa (*Castanea sativa*) e 50% de acácia negra (*Acacia decurrens*). Ambos foram testados em concentrações de 0,00%; 0,40%; 1,70%; 3,20%; 6,25%; 12,50%; 25,00%; 50,00% e 100,00%. A atividade antibacteriana foi feita pela técnica de disco-difusão e diluição em caldo. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo, utilizando-se microplacas de 96 poços. Para a concentração bactericida mínima (CBM) foram inoculadas em meio Tayer Martin, desprovido de antimicrobianos, realizado em triplicata, sendo considerada CBM a menor concentração do blend de ácidos orgânicos que apresentou subcultivo negativo ou média de 0,1 UFC. Determinada a CBM, a concentração inibitória mínima foi utilizada para avaliar o crescimento das bactérias na presença dos ácidos orgânicos em função do tempo, determinando-se as curvas de sobrevivência da *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. Após a realização das análises, verificou-

se que, para as cepas de *Escherichia coli* testadas, a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 50%, tanto para o produto composto pelo blend de ácidos orgânicos quanto para o blend de ácidos orgânicos com adição do extrato de plantas. Já a concentração bactericida mínima (CBM) foi de 100% para ambos os produtos testados, isto é, foi necessário o emprego dos produtos puros. Em relação às cepas de *Salmonella* spp. estudadas, verificou-se que tanto a concentração inibitória mínima (CIM) quanto a concentração bactericida mínima (CBM) foram de 100% para os produtos avaliados. Também foi observado que o efeito bactericida do blend de ácidos orgânicos frente a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. depende tempo de exposição ao produto. Para *E. coli*, observou-se que o tempo necessário para eliminar 100% das cepas foi de quatorze horas na presença do *blend* de ácidos orgânicos e de treze horas no composto de ácidos orgânicos mais extrato de plantas. Já quando cepas de *Salmonella* spp. foram expostas ao blend de ácidos orgânicos em diferentes tempos, o tempo de sobrevivência foi de onze horas na presença dos ácidos orgânicos e treze horas no composto de ácidos orgânicos mais extrato de plantas.

**Palavras-chave:** diarreia em bezerros, ácido benzoico, ácido fumárico, ácido fórmico, acácia negra, castanha portuguesa

# INHIBITORY CONCENTRATION AND MINIMUM BACTERICIDE OF ORGANIC ACIDS, ASSOCIATED OR NOT, AGAINST *Escherichia coli* E *Salmonella* spp

## ABSTRACT

Organic acids and some herbal extracts have an antimicrobial effect, so they may have control in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. They are the main cause of diarrhea syndrome in young calves and an important cause of morbidity and mortality, resulting in considerable economic losses to cattle ranchers. In this series, several enteropathogens may be involved, alone or in association, with *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. Being two of the main causative agents of this syndrome. In this sense, organic acids and some herbal extracts may be an alternative in the control of diarrhea in neonatal calves, since they present antimicrobial effect. However, organic acids and salts are popular and very well documented in swine and poultry production, but information on the possible effects of these compounds on the control of diarrhea in calves is still unknown. This study aimed to determine the antimicrobial activity of a blend of organic acids, associated or not with herbal extract, in the in vitro control of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., agents that cause diarrhea in lactating calves. For the study, standard strains were used: *Escherichia coli* O157: H7 ATCC 43888 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* CCD S003, reactivated in Tayer's agar medium and incubated for 24 hours at 37 ° C. The blend of organic acids employed was composed of 25% benzoic acid, 30% formic acid, 25% fumaric acid and 20% silica. The blend of organic acids associated with the plant extracts was composed of 21.2% benzoic acid, 25.5% formic acid, 21.2% fumaric acid, 17.1% silica dioxide and 15% vegetable. In turn, the plant extract was composed of 50% Portuguese chestnut (*Castanea sativa*) and 50% black acacia (*Acacia decurrens*). Both were tested in concentrations of 0.00%, 0.40%, 1.70%, 3.20%, 6.25%, 12.50%, 25.00%, 50.00% and 100.00%. The antibacterial activity was done by the disc-diffusion technique and dilution in broth. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the microdilution technique in broth, using 96-well microplates. The minimum bactericidal concentration (MBC) was inoculated in Tayer Martin medium, devoid of antimicrobials, carried out in triplicate, being CBM the lowest concentration of the blend of organic acids that presented negative subculture or a mean of 0.1 CFU. The minimum inhibitory concentration was determined to determine the growth of bacteria in the presence of organic acids as a function of time, and the survival curves of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp were determined. After the analyzes, it was verified that for the *Escherichia coli* strains tested, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 50%, both for the product composed of the blend of organic acids and for the blend of organic acids with addition of the plant extract. The minimum bactericidal concentration (MBC) was 100% for both products tested, that is, it was necessary to use the pure products. In relation to the strains of *Salmonella* spp. studied, it was verified that both the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bacterial concentration (CBM) were 100% for the evaluated products. It was also observed that the bactericidal effect of the blend of organic acids against

Escherichia coli and Salmonella spp. depends on time of exposure to the product. For E. coli, it was observed that the time required to eliminate 100% of the strains was fourteen hours in the presence of the blend of organic acids and thirteen hours in the compound of organic acids plus plant extract. When strains of Salmonella spp. were exposed to the blend of organic acids at different times, the survival time was eleven hours in the presence of organic acids and thirteen hours in the compound of organic acids plus plant extract.

**Keywords:** diarrhea in calves, benzoic acid, fumaric acid, formic acid, black acacia, portuguese chestnut.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Relevância do tema.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Fundamentação.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1 Enterobactérias.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2.1 <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2.2 <i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2 Ácidos orgânicos e efeito antimicrobiano.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3 Atividades biológicas de extratos de acácia negra e castanha portuguesa.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.4 Diarreia em bezerro.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Local de Estudo.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Linhagens bacterianas e meios de cultivo.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Blend de ácidos orgânicos.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Cinética bactericida do blend de ácidos orgânicos.....</b>	<b>29</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Relevância do tema

Microrganismos do gênero *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* estão amplamente distribuídos no intestino de humanos e animais, incluindo bovinos, o que, em animais imunodeprimidos, pode levar a ocorrência de uma série de distúrbios, como diarreia, por exemplo, ocasionando muitos prejuízos econômicos. Dessa forma, várias maneiras de diminuir e prevenir a ocorrência de bactérias patogênicas em bovinos têm sido pesquisadas, o que resulta em maior segurança alimentar, bem como, maior eficiência de rebanhos [1].

Em bezerros, principalmente àqueles com até um mês de idade, a ocorrência de enterites pode levar a uma série de problemas econômicos relacionados ao atraso no crescimento dos animais, uso de medicamentos, bem como a perda pela morte de animais. Assim, como estratégia para minimizar esses danos, antibióticos e outros agentes foram empregados continuamente na suplementação de rações.

Entretanto, o emprego de antibióticos traz uma série de prejuízos, como a impregnação da carcaça, com conseqüente consumo humano dessa carne, o que está relacionado ao aumento dos casos de resistência bacteriana, por exemplo. Isso levou à proibição do emprego desses agentes em bovinos para exportação em diversos países.

Em conseqüência disso, bem como da preferência da população em consumir carnes oriundas de animais saudáveis, a utilização de outros compostos tem sido pesquisada como alternativa ao emprego de antibióticos, dentre eles, pode-se citar os ácidos orgânicos, os quais tem se mostrado promissores no controle das infecções por *E. coli* e *Salmonella* spp.

## 1.2 Fundamentação

### 1.2.1 Enterobactérias

A família *Enterobacteriaceae* contém uma variedade de espécies amplamente distribuídas na natureza, estando presentes na água, solo, plantas, animais, carne, grãos, ovos, entre outros, com muitas espécies patogênicas para o homem e os animais, sendo consideradas um risco para a saúde pública em todo o mundo. As espécies pertencentes a essa família produzem uma série de fatores de virulência, com importância a *E. coli* e espécies pertencentes aos gêneros *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*, as quais podem causar infecções intestinais e extra intestinais [7].

#### 1.2.1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria gram negativa que, apesar de fazer parte da microbiota [8], coloniza a flora intestinal de mamíferos, como de seres humanos e de aves podendo causar sérios danos à saúde dos consumidores, como diarreias graves, principalmente, em crianças menores de cinco anos. As cepas patogênicas de *E. coli* são classificadas de acordo com seu mecanismo de patogenicidade e quadro clínico, sendo comumente divididas em seis grupos: enterotoxigênico (ETEC); enterohemorrágico, também conhecido como produtor de toxina Vero ou toxina Shiga (EHEC ou VTEC ou STEC); enteroinvasiva (EIEC); enteropatogênica (EPEC); enteroagregativa (EAEC) e adesão difusa (DAEC). Observa-se que o grupo mais prevalente em diarreias agudas é o enterotoxigênico, em seguida o enteroinvasivo [9].

Além disso, a *E. coli* está associada a infecções do trato urinário em humanos, principalmente, em mulheres, devido, entre outros fatores, ao formato do sistema urinário, que apresenta uretra menor e maior proximidade a região perianal [10]. A *E. coli* também está entre as bactérias mais frequentes em casos de infecções hospitalares, sendo um problema de saúde pública, uma vez que comumente tem ocorrido a incidência de bactérias

multirresistentes aos antibióticos. A maioria dos casos de infecções hospitalares ocorre nas unidades de terapias intensivas (UTI), devido a maior gravidade das doenças, de procedimentos invasivos e estado imunológico dos pacientes que são internados nesse setor [11].

Outro problema relacionado à *Escherichia coli*, envolvendo seres humanos, é a meningite bacteriana, um processo inflamatório que envolve o encéfalo e a medula espinhal. Esse tipo de processo inflamatório ocorre, principalmente, em crianças e neonatos, e é responsável por elevados números de casos de morbidade e mortalidade nesta fase [12].

A *E. coli* também pode ser encontrada na microbiota intestinal de diversos animais, desenvolvendo com esses uma relação de mutualismo. Entretanto, não é ainda elucidado totalmente como se dá essa relação, sabe-se que a presença da bactéria auxilia no processo de absorção de vitaminas, por exemplo. É importante ressaltar também que *E. coli* possui muitas cepas que variam em relação à virulência, sendo as patogênicas prejudiciais à saúde dos animais [13].

Dentre as doenças causadas aos animais, a colibacilose tem importância fundamental, afetando principalmente bezerros jovens, nos primeiros dias de vida, provocando diarreia que pode evoluir para morte. A colibacilose caracteriza-se por ser uma doença causada por cepas patogênicas de *E. coli* enteroxigênica (ETEC), sendo o tratamento baseado, essencialmente, na administração de antibacterianos, o que pode trazer uma série de prejuízos, como resistência ao antimicrobiano, efeitos tóxicos e alergias [14]. Assim, pesquisas têm sido feitas com o intuito de investigar tratamentos alternativos aos antibacterianos convencionais para diarreia em bezerros oriunda da infecção por *E. coli*, bem como de outras bactérias patogênicas.

Nesse sentido, uma pesquisa realizada por Malveira et al. [14], que procuraram estudar o efeito antibacteriano de bactérias lácticas probióticas, isoladas de bezerros de corte, mais especificamente *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus* e *L. pentosus*, contra três cepas de *E. coli*, observaram a formação de halos de inibição superiores a 10 mm de diâmetro, bem como resistência ao pH

ácido e sais biliares, demonstrando, assim, que essas bactérias possuem potencial probiótico.

Esses autores comentaram ainda que as bactérias probióticas trazem vários benefícios, podendo ser empregados como agentes adjuvantes com intuito de melhorar a saúde de bezerros neonatos, além de melhorar a resposta imunológica intestinal, sendo, portanto, um grande benefício a adição de probióticos à dieta dos animais. Essas cepas de bactérias ácido-lácticas produzem compostos com potencial antimicrobiano, como ácidos orgânicos, bacteriocinas, ácido láctico, peróxido de hidrogênio, que, entre outros benefícios, inibem a proliferação de bactérias patogênicas, como algumas cepas de *E. coli* [14].

É importante comentar que, pelo fato de algumas bactérias da família Enterobacteriaceae, como *E. coli* e *Samonella* sp., fazerem parte da microbiota intestinal normal de humanos e animais, como os bezerros, o manejo adequado da alimentação se constitui como forma de prevenir proliferação de cepas patogênicas, já que a literatura comenta que a proliferação desses microrganismos é menor em animais sadios e bem nutridos, apesar de não estar bem elucidado como isso ocorre [1].

A *E. coli*, como a maior parte dos agentes patogênicos que afetam mucosas, segue uma estratégia de infecção [15]:

i) colonização da mucosa, ii) evasão das defesas do hospedeiro, iii) multiplicação e iv) dano ao hospedeiro. *E. coli* causadoras de infecções entéricas em geral apresentam diferentes sorotipos e fatores de virulência. A colonização das células intestinais ocorre por meio de adesinas, que podem ser fimbriais ou não. A produção de diversas toxinas, que interagem com enterócitos de maneiras diferentes, também é uma característica comum de cepas diarreio gênicas de *E. coli*. Algumas cepas de *E. coli* interagem com o citoesqueleto das células intestinais, modificando a estrutura das microvilosidades das células das vilosidades intestinais. Esses fatores de virulência são codificados por genes presentes em ilhas de patogenicidade ou em plasmídeos de virulência, podendo ser também transferidos entre cepas de *E. coli* por bacteriófagos. Atualmente, a identificação de genes de virulência por PCR tem demonstrado ser rápida, prática e sensível na identificação de *E. coli* diarreio gênicas [15].

Segundo Ribeiro e Peregmanis [16], apesar da *E. coli* ser considerado um microrganismo comensal, habitando o trato gastrointestinal de mamíferos, ele está associado aos quadros de diarreia, apresentando alto grau de

adaptabilidade aos diversos tipos de hospedeiro, o que está associado à presença de genes que codificam fatores de virulência. Dessa forma, bezerros de aspecto sadio podem carrear o patógeno, contaminando outros animais, o que ocorre principalmente pela via fecal-oral.

É importante citar que as principais cepas de *E. coli* relacionadas à diarreia são: ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); EPEC (*E. coli* enteropatogênica); EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga) e NTEC (*E. coli* necrotoxigênica) [16].

Sabe-se que existem outros patótipos de *E. coli* que causam diarreia em humanos, mas que ainda não foi evidenciado que são diarreicogênicas em bezerros, são elas: EIEC (*E. coli* enteroinvasiva); DAEC (*E. coli* de aderência difusa) e EAEC (*E. coli* enteroagregativa) [17].

#### 1.2.1.2 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. são microrganismos com distribuição mundial, infectando uma série de hospedeiros, como o homem e outras espécies animais, os quais servem também como transportadores, o que facilita ainda mais a sua disseminação [18].

Essa bactéria destaca-se como uma zoonose de relevância mundial. O gênero é composto por duas espécies: *Salmonella bongori* (prevalente em animais de sangue frio); e *Salmonella enterica* (com mais de 2579 sorotipos já identificados), desses, 1531 fazem parte da subespécie *enterica*, de importância em seres humanos e animais [13].

Assim como cepas patogênicas de *E. coli* provocam diarreias em bezerros, espécies de *Salmonella* sp. também ocasionam diarreias importantes nesses animais, como destaque para *Salmonella* (S.) *enterica* subespécie *enterica*, com ênfase para os sorotipos Typhimurium e Dublin. Na salmonelose, os microrganismos atacam porções do sistema digestório, especialmente as porções terminais do íleo e ceco [18].

A diarreia oriunda da infecção pelas cepas patogênicas de *Salmonella* sp. é caracterizada por vários sinais clínicos, sendo que, em animais de até oito semanas de idade, tem-se a presença de diarreia aquosa, aguda e fétida, com

desidratação, desequilíbrio eletrolítico, endotoxemia, bacteremia e até morte. A gravidade da infecção é maior nos indivíduos mais novos, sendo necessária a presença de  $10^9$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. Typhimurium* para que os sinais e sintomas clínicos comecem a aparecer [19].

Dessa forma, vários estudos, têm sido feitos para avaliar as infecções por *Salmonella* sp. em bezerros e formas alternativas de tratamento.

Um estudo realizado por Ávila et al. [19] que buscou avaliar a sintomatologia da infecção induzida em bezerros por *S. Typhimurium*, utilizando, para isso,  $10^9$  UFC desse microrganismo, inoculadas em 12 bezerros machos com idade de 10 a 15 dias, observaram quadro da infecção em todos os animais participantes do experimento. Todos os bezerros apresentaram diarreia e febre, não sendo observado óbito.

Marques et al. [20] realizaram um estudo com *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin que objetivou coletar dados para avaliar um surto de salmonelose ocasionado por esse agente em bezerros, numa fazenda do Maranhão. O surto de salmonelose matou 40,9% dos bezerros, com sintomatologia que incluía febre, anorexia e depressão, além de, em alguns casos, sinais entéricos, neurológicos e respiratórios. Esses autores relataram ainda que, apesar do surto ter sido controlado, a eliminação da *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin no ambiente é difícil, sendo importante a adoção de medidas que controlem a proliferação desse microrganismo no ambiente.

É importante ressaltar que a diarreia em bezerros é uma patologia multifatorial, sendo uma das principais causas de morte de bezerros neonatos, já que a diarreia contribui para a morte de 50 a 75% de bezerros com até três semanas de idade. Dessa forma, a síndrome diarreica neonatal é resultante da combinação de vários fatores relacionados ao ambiente, ao manejo e as características dos bezerros [21].

Santana [22] buscou avaliar o tratamento e a sintomatologia da infecção experimental por *Salmonella Dublin* em bezerros bubalinos, observou que o tratamento com o antibiótico florfenicol não se mostrou eficiente para tratar a infecção, ressaltando-se aqui a busca por formas alternativas de tratamento para infecções em bezerros.

Em outro estudo, Silva et al. [23], com o intuito de comparar as características das infecções experimentais em bezerros recém-nascidos com  $10^8$  UFC de *Salmonella Dublin* e  $10^9$  de *Salmonella Typhimurium*, observou-se que a sintomatologia da infecção por *Salmonella Typhimurium* foi mais intensa até 96 horas da infecção experimental, sendo caracterizada por enterite auto limitante; já os animais que foram inoculados com *Salmonella Dublin* apresentaram agravamento da diarreia após 96 horas da infecção experimental, caracterizando um quadro mais grave, com enterite severa, sintomas respiratórios e até morte.

### 1.2.2 Ácidos orgânicos e efeito antimicrobiano

Os quimioterápicos e antibióticos foram, durante muito tempo, empregados como fatores para o melhoramento de animais. Atualmente, métodos alternativos têm sido requeridos, pois, há uma preocupação com a produção de alimentos que sejam seguros e oriundos de animais saudáveis, sendo fato que o emprego de substâncias químicas, entre elas os antibióticos, podem produzir nos consumidores uma série de reações indesejáveis, as quais podem interferir negativamente em sua saúde, como reações alérgicas, além de poderem levar à produção de microrganismos resistentes aos medicamentos [24].

O aumento da resistência das bactérias aos antibióticos é um fato amplamente reconhecido pela literatura, sendo registrado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial para Saúde Animal (OIE).

A crescente resistência microbiana aos antibióticos é frequentemente relacionada ao uso indiscriminado pela medicina humana, entretanto, também tem sido associada à forma como os alimentos são produzidos, podendo estar relacionada, entre outros fatores, ao emprego de substâncias químicas, como antibióticos, em rações animais, sendo proibida a presença dessas substâncias em carnes voltadas para a exportação. No Brasil, os compostos tetraciclina, penicilinas, cloranfenicol, sulfonamidas sistêmicas, furazolidona, nitrofurazona e avorpacina têm o emprego proibido como aditivos para rações [24].

Ácidos orgânicos são substâncias com estrutura geral  $R-COOH$ , podendo ser derivados de ácidos carboxílicos, como aminoácidos, ácidos

graxos, coenzimas e metabólitos intermediários, entretanto, aqueles com estrutura de ácidos graxos de cadeia curta apresentam atividade antimicrobiana, destacando-se o ácido fórmico, acético, propiônico, butírico, málico, láctico, tartárico, benzoico e cítrico, presentes naturalmente em plantas e animais [24].

Esses compostos apresentam atividade de inibição do crescimento de fungos em matérias-primas e rações, bem como na redução da proliferação de enterobactérias, como *Salmonella* e *Escherichia coli* e melhora as características nutricionais das rações.

Dessa forma, a suplementação das rações dos animais pode ser empregada como uma eficiente estratégia nutricional. Além disso, a dieta suplementada com ácidos orgânicos, em leitões, por exemplo, tem diminuído a ocorrência de diarreia e controlado a proliferação de *E. coli* nesses animais [25].

A ação do efeito antimicrobiano é explicada pelo fato de serem ácidos, podem se encontrar na forma não dissociada, podendo atravessar membranas plasmáticas, o que é facilitado também porque essas moléculas apresentam tamanho pequeno. No interior da célula bacteriana, essas substâncias liberam o próton, transformando-se na forma dissociada, o que afeta diretamente o pH celular, modificando, portanto, a concentração de prótons e a carga elétrica no ambiente extracelular [25].

A redução do pH extracelular, de um modo geral, estimula a ação de enzimas digestivas intestinais, auxiliando no desenvolvimento de um ambiente intestinal favorável para a proliferação de microrganismos benéficos, o que, por competição, também diminui o crescimento de microrganismos patogênicos. Além disso, a presença desses ácidos no ambiente intracelular bacteriano pode levar ao aumento da pressão osmótica, como um dos mecanismos de compensação de carga elétrica, o que leva ao rompimento da parede celular bacteriana [25].

É importante ressaltar que os ácidos orgânicos têm ação antimicrobiana mais eficiente no estômago, pois, devido ao fato de possuírem constante de ionização (pka) maior, estão presentes em maior concentração na forma não-ionizada, podendo, como explicado anteriormente, atravessar a

membrana plasmática das bactérias, liberando o próton no citosol, alterando o pH interno, o que leva ao comprometimento da atividade celular e consequente morte da bactéria [26].

Além da atividade antimicrobiana, os ácidos orgânicos podem exercer outras atividades benéficas em ruminantes, o que é importante economicamente, já que esses animais se constituem na principal fonte de carne e leite para alimentação humana. É importante ressaltar ainda que a utilização dos ácidos orgânicos é segura, pois não são identificados resíduos desses compostos nas carcaças, tendo benefícios semelhantes aos antibióticos promotores de crescimento, por exemplo, levando à redução do pH ruminal e da produção e emissão de metano. Sendo que a maior parte dos estudos realizados envolvem o ácido málico e fumárico [27].

### **1.2.3 Atividades biológicas de extratos de acácia negra e castanha portuguesa**

O número cada vez maior de bactérias entéricas multirresistentes atualmente é considerado um grande desafio. A resistência múltipla à antibióticos está aumentando entre os isolados clínicos de bactérias e o surgimento de resistência as drogas beta-lactamases de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração tem uma terapia complicada. A carga de resistência à cefalosporina de espectro estendido e a outros fármacos beta-lactâmicos entre as Enterobacteraceae é enorme, o que levou a indústria a busca de novos medicamentos, sendo que cerca de 122 drogas de 94 espécies de plantas ativas foram descobertas através de ligações etnobotânicas [14].

Assim, vários estudos [28, 29, 30, 31, 32, 33] com espécies vegetais, com intuito de encontrar novos compostos com atividade antimicrobiana têm sido realizados, bem como outras atividades, entre eles pode-se citar espécies dos gêneros Acácia e Castanha portuguesa.

Um estudo realizado com *Acacia ataxacantha*, do qual buscou avaliar sua atividade antibacteriana e antifúngica, demonstrou sua atividade contra bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas, bem como sua atividade

antifúngica contra *C. albicans*, o que, de acordo com o estudo estava relacionado à atividade de compostos triterpenoides [28].

Um outro estudo realizado com as partes aéreas de *Acacia hydaspica* R. Parker, mostrou importante atividade antioxidante, anti-hemolítica e anticancerígena [29]. Esses autores sugeriram a utilização do extrato dessa planta como conservante em alimentos e/ou na indústria farmacêutica [29].

É importante destacar que espécies do gênero Acácia são muito empregadas em diversas doenças, sendo suas atividades terapêuticas relacionadas especialmente a compostos fenólicos, muito comuns nessas espécies. Nesse sentido, Andrade et al. [30] buscando avaliar a atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia*, especificamente com o extrato bruto e as frações diclorometano e acetato de etila, encontrou maior concentração de compostos fenólicos na fração acetato de etila em relação às outras, implicando diretamente em maior atividade antioxidante, evidenciada pela atividade captadora de radical (IC<sub>50</sub>) [30].

Em relação à castanha portuguesa (*Catanea sativa*), Ronsisvalle et al. [31] avaliaram as propriedades antibacteriana e antioxidante do extrato dessa planta, e observaram atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* [31]. Já Vella et al. [32] extraíram compostos bioativos de *Castanea sativa* e encontraram várias biomoléculas como taninos e flavonoides, e evidenciaram atividade antioxidante desse extrato, como observado no estudo anterior [32].

Braga e Rodrigues [33] comentam ainda que vários estudos com essa planta evidenciam sua atividade antioxidante, anticarcinogênica e cardioprotetora.

Dessa forma, infere-se o grande potencial, como fonte de biomoléculas, das espécies do gênero Acacia e de *Castanea sativa*, tendo em vista a busca de fontes alternativas, principalmente de antimicrobianos, dado o perfil cada vez maior de resistência aos antibióticos por parte das bactérias.

#### 1.2.4 Diarreia em bezerros

O período neonatal em bezerros, que compreende o primeiro mês de vida, caracteriza-se pelas maiores taxas de mortalidade, sendo um período em que os animais são acometidos por diversas patologias, como problemas respiratórios e diarreia, já que ainda estão se adaptando à vida fora do útero [2].

A diarreia em bezerros é um dos principais problemas sanitários que afetam os rebanhos bovinos, pois traz inúmeros prejuízos econômicos oriundos, entre outros fatores, das despesas com o tratamento, do retardo no crescimento dos animais, bem como, da mortalidade [3].

Vários fatores podem levar à ocorrência de diarreia em bezerros, entre eles pode-se citar: animais imunodeprimidos com capacidade reduzida para combater infecções, bem como ambiente, condições nutricionais e sanitárias inadequadas, sendo que esses fatores podem agir sozinhos ou em conjunto. Nessa fase, como estratégia para equilibrar a microbiota intestinal dos animais, podem-se acrescentar aditivos alimentares, como probióticos, por exemplo. A literatura científica tem demonstrado que o acréscimo desses aditivos à alimentação dos bezerros diminui os casos de diarreia, bem como melhora o desempenho dos animais [6].

Dessa forma, a bovinocultura nacional considera, dentre outros fatores, a mortalidade dos bezerros recém-nascidos como de forte impacto para os custos da produção, sendo a diarreia uma das causas mais relacionadas a esses óbitos, o que ocorre por meio de desequilíbrios relacionados ao balanço hidroeletrólítico e ácido-base. Assim, é importante a busca de alternativas para minimizar a ocorrência dessa patologia e, como consequência, reduzir as perdas na produção [4].

Um estudo realizado com 18 bezerros com até um mês de vida, avaliou a fisiopatologia da diarreia nesses animais por meio do modelo de indução dessa patologia nos bezerros com sacarose e diuréticos. Mostrou que esse método pode ser aplicado na indução da diarreia, servindo, assim, para utilização em estudos que busquem comparar diferentes tratamentos para

diarreia em bezerros, já que a sintomatologia aplicada pelos animais se assemelha muito à diarreia espontânea [4].

Vários fatores são apontados como causadores de diarreia em bezerros neonatos, mas, entre eles, os mais importantes são ligados ao animal, ao ambiente e ao agente etiológico, com a salmonelose indicada como uma das principais [5]. Assim, já é consenso na literatura que diversos microrganismos estão envolvidos nos casos de enterites em bezerros, sendo que os principais pertencem ao gênero *Salmonella* spp., com destaque para os sorotipos Dublin e Typhimurium, no qual o *S. Dublin* o mais adaptado à espécie bovina. É importante ressaltar que os principais sinais e sintomas que atingem os bezerros com salmonelose com até seis semanas de idade são: febre, desidratação, diarreia, problemas respiratórios, bacteremia e morte [3].

Além do gênero *Salmonella* spp., a *Escherichia coli* é uma bactéria importante na saúde pública, sendo também causadora de diarreia e mastite em bovinos, aparecendo frequentemente em seu ecossistema ruminal. Assim, o manejo alimentar adequado se constitui em fator importante para diminuir o crescimento de bactérias da família Enterobacteriaceae, já que os animais saudáveis são menos propensos ao crescimento de cepas patogênicas [1].

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo geral**

Determinar a atividade antimicrobiana de um *blend* de ácidos orgânicos com ou sem a associação com extrato de plantas no controle *in vitro* de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhi.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

Determinar a atividade antimicrobiana em *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhi e *Escherichia coli* pelas técnicas de disco difusão e diluição em caldo.

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) pela técnica de microdiluição em caldo de um *blend* de ácidos orgânicos, associados ou não com extrato de plantas.

Avaliar o crescimento das bactérias na presença dos ácidos orgânicos e ácidos orgânicos associados ao extrato de plantas em função do tempo.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Local do estudo

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Brasil, localizado na cidade de Fernandópolis, estado de São Paulo, no ano de 2017.

### 2.2 Linhagens bacterianas e meios de cultivo

Para o estudo, foram utilizadas as linhagens padrões: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi CCD S003, sendo reativadas em meio agarizado de MacConckey (Oxoid®) e incubadas por 24 horas a 37 ° C.

As suspensões bacterianas foram realizadas tomando-se de três a quatro colônias de cada linhagem cultivada em ágar MacConckey, as quais foram inoculadas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid®) e incubadas em condições de aerobiose por 24 horas a 37°C, quando se procedeu à centrifugação (4000 rpm) por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o material precipitado ressuscitado em solução estéril de NaCl (0,85%) e, novamente, submetido à centrifugação. Esse procedimento foi repetido cinco vezes com a finalidade de retirar os componentes do meio de cultura.

Após esse procedimento, a suspensão bacteriana foi diluída em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland, equivalente à concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Essa suspensão bacteriana constituiu o inóculo para avaliação antibacteriana dos óleos pela técnica de microdiluição em placas [CLSI] [34], para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM) e a cinética bactericida do *blend* de ácidos orgânicos.

### 2.3 *Blend* de ácidos orgânicos

O *blend* de ácidos orgânicos foi composto por 25% de ácido benzoico, 30% de ácido fórmico, 25% de ácido fumárico e 20% de dióxido de sílica. Já o *blend* de ácidos orgânicos associado ao extrato de plantas foi composto por 21,2% de ácido benzoico, 25,5% de ácido fórmico, 21,2% de ácido fumárico, 17,1% de dióxido de sílica e 15% de extrato de plantas. Por sua vez, o extrato de plantas foi composto por 50% de castanha portuguesa (*Castanea sativa*) e 50% de acácia negra (*Acacia decurrens*).

Os produtos avaliados foram utilizados em concentrações de 0,00%, 0,40%, 0,80%, 1,70%, 3,20%, 6,25%, 12,50%, 25,00%, 50,00% e 100,00%.

### 2.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Todas as avaliações foram realizadas em caldo BHI suplementado com detergente Tween 20 (concentração final de 0,5% (v / v)). As linhagens de *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi CCCD S003 foram suspensas, individualmente, em caldo BHI para dar uma densidade final de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, e estas foram confirmadas por contagens de células viáveis. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram avaliadas de acordo o procedimento recomendado pela CLSI (2012). A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em placas de noventa e seis poços. Após incubação a 37°C por 24h, a CIM foi avaliada, e presença de células bacterianas viáveis nas concentrações não inibitórias foi determinada pela adição, em cada amostra, do corante 2,3,5 -Triphenyltetrazolium Chloride, no volume de 50 µL. Isto tornou possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantiveram a sua cor [35]. A concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração do *blend* de ácidos orgânicos capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano [36].

## 2.5. Cinética bactericida do blend de ácidos orgânicos

Foi empregada a metodologia descrita por Allahghadri et al. [37]. Foram adicionados em tubos de 40 mL do *blend* de ácidos orgânicos na diluição determinada por CBM a cada 5mL de caldo de BHI contendo suspensão bacteriana de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> e foram, em seguida, incubados a 37°C. Amostras (0,1 mL) foram retiradas a cada 10 minutos por um período de 180 min. As amostras foram imediatamente lavadas com tampão de fosfato estéril, pH 7,0, centrifugadas a 10000 rpm, ressuspensas no tampão e depois foram espalhadas em cultura ágar BHI durante 24h a 37°C. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata. As colônias microbianas foram contadas após o período de incubação. Foi realizada uma avaliação sobre a variação da carga microbiana a fim de observar qual *blend* apresentou a maior variação negativa (queda) na contagem microbiana.

## 2.6. Análise estatística

Os dados referentes a UFC de *Escherichia coli* e *Salmonella*. foram transformados em Log (UFC+1) para atender as prerrogativas de normalidade, homogeneidade de variância, análise de resíduo e aleatoriedade das observações e posteriormente foram analisados em um esquema fatorial em parcela subdivida no tempo (parcela = UFC e subparcelas = momento, horas) e as médias confrontadas pelo teste Tukey ao nível de 95% de confiabilidade. As três repetições observadas para UFC foram sumarizadas em médias dentro de cada momento (hora) para a realização de seleção do modelo de análise de regressão linear simples e quadrática. Todas as análises foram aferidas utilizando o pacote estatístico do software Statistica, versão 12 (StatSoft, 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização das análises, verificou-se que, para as cepas de *Escherichia coli* testadas, a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 50%, tanto para o produto composto pelo blend de ácidos orgânicos quanto para o blend de ácidos orgânicos com adição do extrato de plantas. Já a concentração bactericida mínima (CBM), ou seja, a concentração mínima necessária para lisar as células de *Escherichia coli*, foi de 100% para ambos os produtos testados, isto é, foi necessário o emprego dos produtos puros.

Em relação às cepas de *Salmonella* spp. estudadas, após a realização das análises, verificou-se que tanto a concentração inibitória mínima (CIM) quanto a concentração bactericida mínima (CBM) foram de 100% para os produtos avaliados, ou seja, foi necessário o emprego do blend de ácidos orgânicos ou ácidos orgânicos mais extrato de plantas, sem diluição, para se chegar aos resultados desejados.

Em um estudo realizado por Freitas et al. [25] buscou-se avaliar o desempenho do uso de concentrações crescentes (0,59%, 0,63%, 0,66%, 0,78%, 0,84%, 0,90%) de ácidos orgânicos, à base de ácido láctico, na dieta de leitões com 21 a 49 dias de idade em relação ao desempenho e a ocorrência de diarreia. Os resultados desse estudo evidenciaram que os leitões que receberam uma dieta suplementada com 0,84% de ácidos orgânicos tiveram melhor resultado na conversão alimentar e no escore fecal. Além disso, também observaram que nas fezes dos animais alimentados com rações suplementadas com concentrações de 0,84%, em animais de 21 a 35 dias, e 0,63%, em animais de 36 a 49 dias, não foram encontradas as bactérias *E. coli*  $\alpha$ -hemólise e *Streptococcus* sp.

Quanto ao tempo de sobrevivência das cepas testadas, a Tabela 1 apresenta os dados relativos à efetividade da ação dos produtos testados em função do tempo de exposição dos microrganismos aos princípios ativos.

Tabela 1 Resultado das comparações múltiplas referentes ao tempo de sobrevivência das cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., dados transformados em Log (ufc+1).

Momento (horas)	Bactéria	Grupos Experimentais/Médias e Desvios Padrões <sup>1</sup>	
		Ácidos orgânicos	Ácidos orgânicos + extrato de plantas
0	<i>Escherichia coli</i>	6,08±0,00Aa	6,00±0,00Ba
1		4,26±0,24Bab	5,07±0,02Aa
2		4,74±0,01Ba	4,91±0,00Aab
3		3,63±0,06Bab	4,32±0,00Aab
4		3,83±0,00Aab	3,00±0,00Bab
5		3,58±0,01Bab	3,86±0,01Aab
6		2,75±0,05Bab	3,50±0,02Aab
7		2,72±0,01Aab	2,48±0,00Bab
8		2,44±0,02Bab	2,91±0,01Aab
9		2,18±0,00Bab	2,74±0,01Aab
10		1,04±0,00Bab	2,35±0,03Aab
11		1,89±0,00Aab	1,67±0,54Aab
12		1,43±0,00Aab	1,19±0,51Aab
13		0,66±0,10Ab	0,00±0,00Bab
14	0,00±0,00Ab	0,00±0,00Ab	
0	<i>Salmonella</i> spp.	6,00±0,00Ba	6,10±0,02Aa
1		4,26±0,24Aab	3,97±0,01Ba
2		3,50±0,17Aab	3,54±0,01Aab
3		3,74±0,00Aab	2,93±0,00Bab
4		2,70±0,00Bab	2,80±0,01Aab
5		2,32±0,27Bab	2,53±0,01Aab
6		2,92±0,01Aab	2,18±0,00Bab
7		2,49±0,01Aab	1,49±0,00Bab
8		1,89±0,03Aab	1,81±0,00Bab
9		1,39±0,57Aab	1,69±0,01Aab
10		0,46±0,15Bab	1,36±0,01Aab
11		0,00±0,00Bb	0,97±0,03Aab
12		0,00±0,00Bb	0,60±0,00Aab
13		0,00±0,00Ab	0,00±0,00Ab
14	0,00±0,00Ab	0,00±0,00Ab	

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p \geq 0,05$ )

As concentrações de *E. coli* expostas ao blend de ácidos orgânicos diferiram quanto ao tempo de exposição ao produto, sendo menores com 13 e

14 h de exposição em relação ao tempo de 0 e 2 h. Nos demais tempos avaliados, não houve diferença significativa na alteração das concentrações de *E. coli* ( $P>0,05$ ).

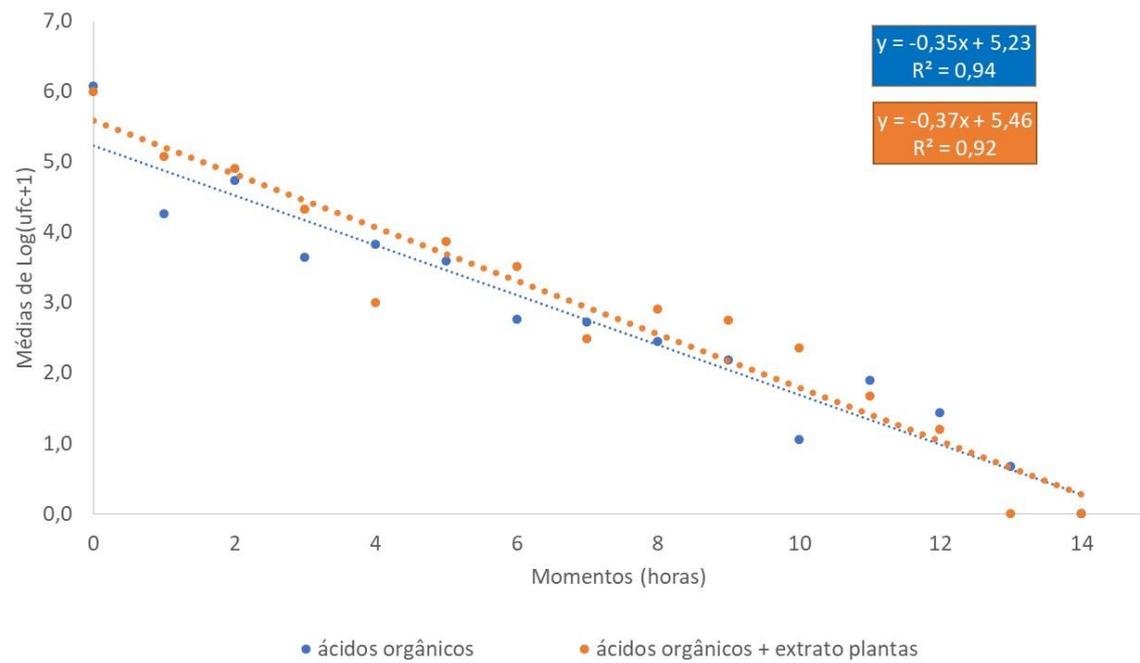
Quando as cepas de *E. coli* foram submetidas a diferentes tempos de exposição ao blend de ácidos orgânicos mais extrato de plantas, observou-se diferença de concentração, sendo menores no tempo de 14h em relação a 0 e 1h de exposição. Nos demais tempos avaliados, não houve diferença significativa nas concentrações de *E. coli* ( $P>0,05$ ).

Para *E. coli*, observou-se que o tempo necessário para eliminar 100% das cepas foi de quatorze horas na presença do *blend* de ácidos orgânicos e de treze horas no composto de ácidos orgânicos mais extrato de plantas.

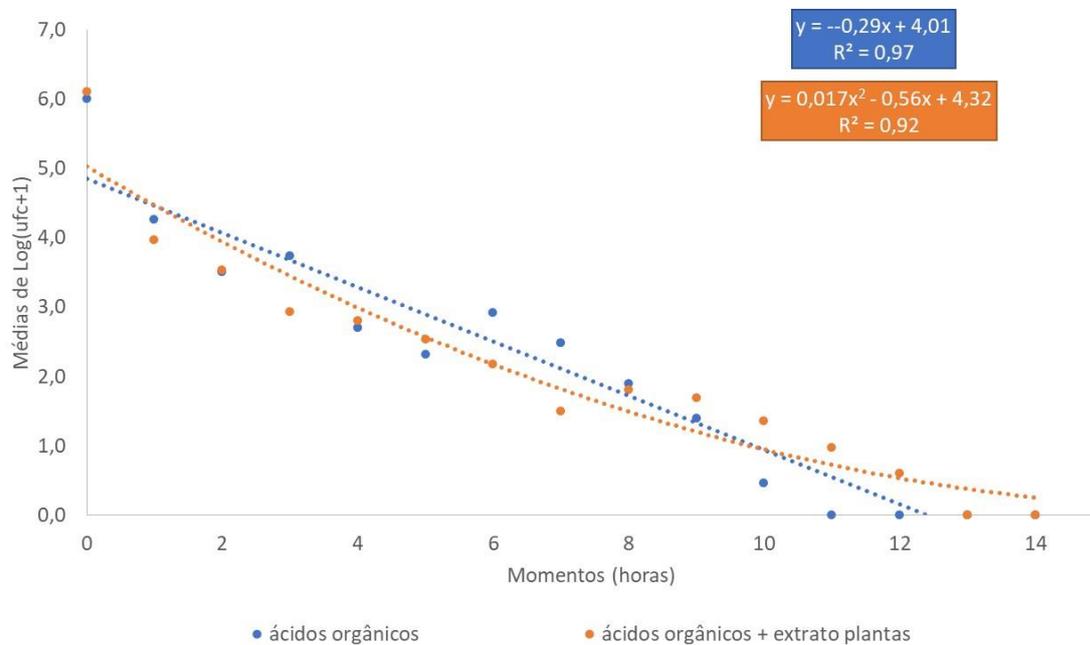
Já, quando cepas de *Salmonella* spp. foram expostas ao blend de ácidos orgânicos em diferentes tempos, observou-se diferença ( $p<0,05$ ) entre os horários de 0 (maior concentração) e de 11 a 14 h (menores concentrações), que não diferiram dos demais tempos de exposição. Com a utilização do blend de ácidos orgânicos mais extrato de plantas, houve diferença entre os tempos de 0 e 1 h (maiores concentrações) comparados à exposição de 13 e 14 h (menores concentrações), ( $p<0,05$ ), que por sua vez não diferiram para os demais períodos de exposição ao produto. O tempo de sobrevivência foi de onze horas na presença dos ácidos orgânicos e treze horas no composto de ácidos orgânicos mais extrato de plantas.

Houve efeito antagônico entre o tempo de sobrevivência das UFC de *E. coli* e o tempo de exposição aos ácidos orgânicos, associados ou não ao extrato de plantas, com porcentagens acima de 92% determinando a explicação dos valores observados (Figura 1).

Resposta similar foi obtida com relação ao tempo de sobrevivência das UFC de *Salmonella* spp. e o tempo de exposição aos ácidos orgânicos, com redução linear das UFC com o aumento do tempo de exposição ao produto, com coeficiente de determinação de 97%. Já, para a associação dos ácidos orgânicos com extrato de plantas, houve efeito quadrático quanto ao tempo de exposição ao produto e a redução das UFC de *Salmonella* spp., com coeficiente de determinação de 92% (Figura 2).



**Figura 1:** Resultado da análise dos dados de UFC, em log, para *E. coli* dos grupos experimentais



**Figura 2:** Resultado da análise dos dados de UFC, em log, para *Salmonella* dos grupos experimentais

#### 4 CONCLUSÕES

O blend de ácidos orgânicos, associados ou não ao extrato vegetal, testados no presente trabalho, mostraram importante atividade contra *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Todavia, a atividade antibacteriana dos produtos depende da concentração empregada e do tempo de exposição aos produtos.

Para as cepas de *Escherichia coli* testadas, a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 50%, tanto para o produto composto pelo blend de ácidos orgânicos quanto para o blend de ácidos orgânicos com adição do extrato de plantas. Já a concentração bactericida mínima (CBM) foi de 100% para ambos os produtos testados. Para cepas de *Salmonella* spp. estudadas verificou-se que tanto a concentração inibitória mínima (CIM) quanto a concentração bactericida mínima (CBM) foram de 100% para os produtos avaliados.

No que diz respeito ao tempo necessário para eliminar 100 % das cepas, para *E. coli*, esse tempo foi quatorze horas na presença do *blend* de ácidos orgânicos e de treze horas no composto de ácidos orgânicos mais extrato de plantas. Para *Salmonella* spp., o tempo de sobrevivência foi de onze horas na presença dos ácidos orgânicos e treze horas no composto de ácidos orgânicos mais extrato de plantas.

## REFERÊNCIAS

1. Vieira EA, Abrão FO, Ribeiro ICO, Nigri ACA, Silva KF, Careli RT, Geraseev LC, Duarte ER. Bastonetes gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados com pastagem lignificada e em novilhos com acidose ruminal. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2015; 35(9): 811-816.
2. Benesi FJ, Bertagnon HG, Wachholz L, Leal MLR, Fernandes WR, Benites NR, Melville PA. Microbiota bacteriana e citologia da região traqueobrônquica de bezerros no período neonatal. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013; 33(6): 700-704.
3. Silva DG, Silva PRL, Fagliari JJ. Hemograma e perfil bioquímico sérico, inclusive hemogasométrico, de bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Dublin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2010; 62(2): 251-257.
4. Leal MLR, Cyrillo FC, Mori CS, Michima LES, Nichi M, Ortolani EL, Benesi FJ. Modelo de indução de diarreia osmótica em bezerros holandeses. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2008; 38(6): 1650-1657.
5. Ávila LG. Estudo clínico, laboratorial e terapêutico de diarreia experimental em bezerros induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, 2009.
6. Torrezan TM, Silva JT, Miqueo E, Rocha NB, Silva FLM, Baldassin S, Bittar CMM. Desempenho de bezerros leiteiros recebendo probiótico *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 2016; 17(3): 508-519.
7. Zobot S. Atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos e compostos clorados sobre microrganismos patogênicos em carne de frango. 2016. 97f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Londrina, 2016.
8. Campos MRH, Kipnis A, André MCDPB, Vieira CAS, Jayme LB, Santos PP, Serafini AB. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*. 2006; 36(4).
9. Rodríguez-Angeles G. Principais características e diagnóstico dos grupos patogênicos de *Escherichia coli*. *Saúde pública México*. 2002; 44(5).

10. Heilberg IP, Schor N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – ITU. Revista Associação Medicina Brasileira. 2003; 49(1): 109-116.
11. Leiser JJ, Tognim MCB, Bedendo J. Infecções Hospitalares em um Centro de Terapia Intensiva de um Hospital de Ensino no Norte do Paraná. Ciências Cuidado Saúde. 2007; 6(2): 181-186.
12. Romanelli RMC, Araújo CA, Dias MW, Boucinhas F, Carvalho IR, Martins NRL, Freire HMF. Etiologia e evolução das meningites bacterianas em centro de pediatria. Jornal de Pediatria. 2002; 78(1): 24-30.
13. Lopes ES, Maciel WC, Teixeira RSC, Albuquerque AH, Vasconcelos RH, Machado DN, Bezerra WGA, Santos ICL. Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psitacíformes: relevância em saúde pública. Arquivos do Instituto Biológico. 2016; 83: 1-10.
14. Malveira DS, Guimarães F, Veloso VA, Duarte ER, Brandi IV, Pinto MS. Bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de bezerros nelore criados no semiárido. Acta Veterinária Brasílica. 2016; 10(4): 290-297.
15. Coura FM, Lage AP, Heinemann MB. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2014; 34(9).
16. Ribeiro DMC, Perecmanis S. Detecção de genes de enterotoxinas e adesinas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de bezerros no Distrito Federal, Brasil. In: Perfil parasitológico e detecção de genes de enterotoxinas e adesinas de *Escherichia coli*, isoladas de fezes de bezerros no Distrito Federal, Brasil. 2017. 48f. (Mestrado). Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Programa de Pós-graduação em Saúde Animal. Brasília, DF, 2017.
17. Coura FM. Caracterização molecular de *Escherichia coli* isoladas de bovinos, bubalinos e aves. 2016. 101f. (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. Belo Horizonte, MG, 2016.
18. Corrêa IMO, Flores F, Schneiders GH, Pereira LQ, Brito BG, Lovato M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2013; 33(2): 241-246.
19. Ávila LG, Silva DG, Sato RA, Fagliari JJ. Avaliação clínica da infecção experimental de bezerros com *Salmonella* Typhimurium. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2011; 63(6).
20. Marques ALA, Simões SVD, Garino Jr. F, Maia LA, Silva TR, Riet-Correa B, Lima EF, Riet-Correa F. Surto de salmonelose pelo sorovar Dublin em bezerros no Maranhão. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2013; 33(8).

21. Carvalho JG, Carvalho AU, Heinemann MB, Coelho SG, Paes PRO, Moreira GHFA, Vespasiano LC, Facury Filho EJ. Estudo longitudinal da infecção por enteropatógenos em bezerros neonatos, com diarreia, sob diferentes estratégias de aleitamento. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014; 34(6).
22. Santana AM, Silva DG, Pizauro L JL, Bernades PA, Flagliari. Sinais clínicos da infecção experimental de bezerros bubalinos por *Salmonella enterica* subespécie enterica sorotipo Dublin. *Ciência Animal Brasileira*. 2009. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, Suplemento I.
23. Silva DG, Ávila LG, Silva PRL, Sato RA, Flagliari. Estudo comparativo da infecção experimental de bezerros com *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Typhimurium. 2009. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, Suplemento I.
24. Corrêa IMO, Flores F, Schneiders GH, Pereira LQ, Brito BG, Lovato M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013; 33(2): 241-246.
25. Freschi JB. Ácidos orgânicos isolados ou associados em dietas de frangos de corte. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2014.
26. Freitas LS, Lopes DC, Freitas AF, Carneiro JC, Corassa A, Pena SM, Costa LF. Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 anos de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006; 35(4): 1711-1719.
27. Marafon F, Beltrame JAM. Ácidos orgânicos como aditivos nutricionais para ruminantes. 2011. 21f. Revisão (Pós-graduação). Curso de pós-graduação lato sensu em Produção de Bovinos de Corte, Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná, Guarapuava-PR, 2011.]
28. Amoussa AMO, Lagnika L, Sanni A. Triterpenoids from *Acacia ataxacantha* DC: antimicrobial and antioxidante activities. *BMC Complement Altern Med*. 2016; 16: 284.
29. Afsar T, Razak S, Khan MR, Mawash S, Almajwal A, Shabir M, Haq IU. Evaluation of antioxidante, anti-hemolytic and anticâncer activity of various solvente extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts. *BMC Complement Altern Med*. 2016; 16: 258.
30. Andrade CA, Costa CK, Bora K, Miguel MD, Miguel OG, Kerber VA. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex. G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17:2.
31. Ronsisvalle S, Lissandrell E, Fuochi V, Petronio GP, Straquadanio C, Crasci L, Panico A, Millito M, Cova AM, Tempera G, Furneri PM. Antioxidant and

antimicrobial properties of *Castanea sativa* Miller chestnut honey produced on Mount Etna (Sicily). Natural Product Research. 2017.

32. Vella, FM, Laratta B, Cara F, Morana A. Recovery of bioactive molecules from chesrnut (*Catanea sativa* Mill.) by-products through extraction by different solvents. Natural Product Research. 2018; 32:9.

33. Braga N, Rodrigues F. *Castanea sativa* by-products: a review on added value and sustainable application. Natural Product Research. 2015; 29:1.

34. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second Informational Supplement M100-s22, Wayne, PA.; 2012; 32(3):1-184.

35. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. Meth. Mol. Biol.; 2011; 716:157-168. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21318905>.

36. Favre B; Hofbauer B; Hildering K; Ryder NS. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. J. Clin. Microbiol.; 2003; 17:41:48. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC254304/>.

37. Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P., Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, Astaneh SD. Antimicrobial property, antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran, J. Food Sci. 2010; 75(2): H54-H61. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492235>