

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COM E SEM EXTRATO VEGETAL NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Escherichia coli* E *Salmonella Typhi*

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ORGANIC ACIDS WITH OR WITHOUT VEGETABLE EXTRACTS FOR *IN VITRO* CONTROL OF *Escherichia coli* AND *Salmonella Typhi*

P. H. M. DIAN^{1,5}, P. E. R. JOPPERT¹, D. I. KOZUSNY-ANDREANI², V. E. SOARES¹,
M. A. A. BELO^{1,3}, G. M. P. MELO¹, M. D. PACHECO⁴

RESUMO

Os ácidos orgânicos e alguns extratos herbais podem ser uma alternativa no controle microbiano. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana de uma combinação de ácidos orgânicos com ou sem adição de extratos de *Catanea sativa* e *Acacia decurrens* no controle *in vitro* de *Escherichia coli* e *Salmonella Typhi*. Para o estudo, foram utilizadas cepas padrões: *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (CCCD S003). A combinação de ácidos orgânicos foi composta por 25% de ácido benzoico, 30% de ácido fórmico, 25% de ácido fumárico e 20% de dióxido de sílica. Já a combinação de ácidos orgânicos associada ao extrato vegetal foi composta 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, sendo este último 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%. O estudo das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) das misturas demonstraram para *Escherichia coli* um CIM de 50% e CBM de 100%, tanto para o produto composto pela mistura de ácidos orgânicos quanto para a mistura de ácidos orgânicos com adição do extrato de plantas. Em relação à cepa de *Salmonella* estudada verificou-se CIM e CBM de 100%, alcançados com 100% de concentração dos compostos estudados. As concentrações de *E. coli* e *Salmonella Typhi* expostas a ambos os tratamentos de ácidos orgânicos com ou sem os extratos de plantas diferiram quanto ao tempo de exposição ao produto ($p < 0,05$). A atividade antibacteriana dos produtos depende da concentração empregada dos ácidos orgânicos com ou sem os extratos de plantas e do tempo de exposição aos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido benzoico. Ácido fumárico. Ácido fórmico. Acácia negra. Castanha portuguesa.

SUMMARY

Organic acids and some herbal extracts can be an alternative in microbial control. This study evaluated the antimicrobial activity of a combination of organic acids with or without the addition of extracts of *Catanea sativa* and *Acacia decurrens* in the *in vitro* control of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhi*. For the study, standard strains were used: *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43888) and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (CCCD S003). The combination of organic acids was composed of 25% benzoic acid, 30% formic acid, 25% fumaric acid and 20% silica dioxide. The combination of organic acids associated with the plant extract was composed of 21.2% benzoic acid, 25.5% formic acid, 21.2% fumaric acid, 17.1% silica dioxide and 15% extract vegetable, the latter consisting of 50% Portuguese chestnut (*Castanea sativa*) and 50% black wattle (*Acacia decurrens*). Both were tested at concentrations of 0.00%; 0.40%; 1.70%; 3.20%; 6.25%; 12.50%; 25.00%; 50.00% and 100.00%. The study of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) of the mixtures showed for *Escherichia coli* a MIC of 50% and MBC of 100%, both for the product composed of the mixture of organic acids and for the mixture of organic acids with the addition of plant extract. Regarding the *Salmonella* strain studied, MIC and MBC of 100% were found, achieved with 100% concentration of the studied compounds. The concentrations of *E. coli* and *Salmonella Typhi* exposed to both treatments of organic acids with or without plant extracts differed regarding the time of exposure to the product ($p < 0.05$). The antibacterial activity of the products depends on the concentration of organic acids used with or without plant extracts and the time of exposure to them.

KEY-WORDS: Benzoic acid. Fumaric acid. Formic acid. Black acácia. Portuguese chestnut.

¹ Universidade Brasil, Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Av. Hilário da Silva Passos, 950. Pq. Universitário, Descalvado-SP, Brasil.

² Universidade Brasil, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Est. Projetada F-1, s/n, Fazenda Santa Rita, Fernandópolis-SP, Brasil.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FCAV-UNESP, Rod. Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, S/N, Jaboticabal/SP, Brasil.

⁴ Nutract Agroindustrial Ltda, R. Jacinto Patussi - Quedas do Palmital, Chapecó - SC.

⁵ Autor correspondente: Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian. Email: phmdian@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

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) (Ortega et al., 2016). A crescente resistência dos microrganismos aos compostos antimicrobianos é frequentemente relacionada ao uso indiscriminado destas substâncias na medicina veterinária e humana (Ortega et al., 2017). Microrganismos do gênero *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* estão amplamente distribuídos no intestino de humanos e animais, podendo levar a ocorrência de uma série de distúrbios e ocasionando muitos prejuízos econômicos e de saúde pública (Amrutha et al., 2017).

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 (Rodríguez-Angeles et al., 2002). Enquanto, as bactérias do gênero *Salmonella* spp. são microrganismos com distribuição mundial, infectando uma série de hospedeiros, como o homem e outras espécies animais, destacando-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 (Lopes et al., 2016).

Por outro lado, os quimioterápicos e antibióticos vem sendo empregados no manejo sanitário e como promotores de crescimento na produção animal. Entretanto, métodos alternativos têm sido largamente estudados, tendo em vista a crescente preocupação com a produção de alimentos que sejam seguros para o consumo humano e oriundos de animais saudáveis (Correa et al., 2013). Neste contexto, vem se destacando o estudo dos ácidos orgânicos, substâncias com estrutura geral R-COOH, derivados de ácidos carboxílicos, como aminoácidos, ácidos graxos, coenzimas e metabólitos intermediários. Dentre os ácidos orgânicos aqueles com estrutura de ácidos graxos de cadeia curta apresentam atividade antimicrobiana, como o ácido fórmico, acético, propiônico, butírico, málico, láctico, tartárico, benzoico e cítrico, presentes naturalmente em plantas e animais (Correa et al., 2013).

Espécies do gênero *Acácia* são muito empregadas em diversas doenças, sendo suas atividades terapêuticas relacionadas especialmente a compostos fenólicos. Extratos de *Acacia decurrens* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni* na concentração de 64 µg / mL

(Kurekci et al., 2012) e na inibição de produção de lactato ruminal na concentração de 5mg/mL, pois inibiu o crescimento de *Lactobacillus* YE08 (Hutton et al., 2012). Enquanto, extratos da castanha portuguesa (*Catanea sativa*) demonstraram propriedades antibacterianas e antioxidantes com atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (Rosisvalle et al., 2017).

Partindo da importância das enterobactérias para a saúde humana e animal, associado à necessidade de buscar alternativas para controle de microrganismos patogênicos, avaliou-se a atividade antimicrobiana de um composto de ácidos orgânicos com ou sem adição de extratos de *Catanea sativa* e *Acacia decurrens* no controle *in vitro* de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi.

MATERIAL 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. O estudo visou determinar a atividade antimicrobiana de uma combinação de ácidos orgânicos e da associação de um composto de ácidos orgânicos com extrato de plantas no controle *in vitro* de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi.

2.2 Microrganismos e meios de cultivo

Para o estudo, foram utilizadas as cepas 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 ressuspenso 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 (Ramos et al., 2016).

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 (2012), para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM) e a cinética bactericida do composto de ácidos orgânicos (Ramos et al., 2016).

2.3. Composto de ácidos orgânicos

A combinação de ácidos orgânicos foi obtida a partir da mistura de 25% de ácido benzoico, 30% de ácido fórmico, 25% de ácido fumárico e 20% de dióxido de sílica. Já a combinação de ácidos orgânicos associada ao extrato de plantas foi obtida a partir de 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*). A atividade antimicrobiana dos produtos avaliados foi testada a partir de 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⁻¹, 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 (Sylvester, 2011). A concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração da mistura de ácidos orgânicos capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano (Favre et al., 2003).

2.5. Cinética bactericida do composto de ácidos orgânicos

Foi empregada a metodologia descrita por Allahghadri et al. (2010). Foram adicionados em tubos de 40 mL o composto de ácidos orgânicos na diluição determinada por CBM a cada 5mL de caldo de BHI contendo suspensão bacteriana de 10^6 UFC mL⁻¹ 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 10.000 rpm, ressuspendidas 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 mistura 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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) com 0,00%, 0,40%, 0,80%, 1,70%, 3,20%, 6,25%, 12,50%, 25,00%, 50,00% e 100,00% dos compostos revelaram para a cepa de *Escherichia coli* CIM de 50% e CBM de 100%, tanto para o produto composto pela combinação de ácidos orgânicos quanto para o composto de ácidos orgânicos com adição do extrato de plantas.

Em relação à cepa de *Salmonella* estudada verificou-se CIM e CBM de 100%. Portanto, sendo necessário a adição pura de 100% de concentração dos compostos estudados. Em um estudo realizado por Freitas et al. (2006) 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 *E. coli* α -hemólise e *Streptococcus* sp. Os resultados desse estudo evidenciaram que os leitões que receberam dieta suplementada com 0,84% de ácidos orgânicos tiveram melhores resultados na conversão alimentar e no escore fecal.

No que diz respeito ao tempo de sobrevivência das cepas testadas, os dados apresentados na Tabela 1 demonstram que a efetividade da ação dos produtos testados ocorre em função do tempo de exposição dos microrganismos aos princípios ativos.

As concentrações de *E. coli* expostas a ambos os tratamentos de ácidos orgânicos com ou sem os extratos de plantas diferiram quanto ao tempo de exposição ao produto, sendo significativamente ($p < 0,05$) menores com 13 e 14 h de exposição em relação ao tempo de 2 e 1 h, para os compostos sem ou com extrato de plantas, respectivamente. Nos demais tempos avaliados, não houve diferença significativa na alteração das concentrações de *E. coli* ($P > 0,05$). As cepas CCM 3954 e CCM 4225 de *E. coli* foram inibidas pelo ácido cáprico a 5 mg / mL. Para *E. coli*, observou-se neste estudo que o tempo necessário para eliminar 100% das cepas foi de quatorze horas na presença do composto de ácidos orgânicos e de treze horas no composto de ácidos orgânicos mais extrato de plantas.

Tabela 1 - Resultado das comparações múltiplas referentes ao tempo de sobrevivência das cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Momento (horas)	Bactéria	Grupos Experimentais/Médias e Desvios Padrões ¹	
		Ácidos orgânicos ²	Ácidos orgânicos + extrato de plantas ²
0	<i>Escherichia coli</i>	6,08±0,00Aa	6,00±0,00Aa
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±0,00Bb
14	0,00±0,00Ab	0,00±0,00Ab	
0	<i>Salmonella Typhi</i>	6,00±0,00Aa	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 ($p \geq 0,05$). 2: Dados transformados em log (ufc+1)

Já, quando cepas de *Salmonella* spp. foram expostas ao composto de ácidos orgânicos em diferentes tempos, observou-se diferença ($p < 0,05$) entre os tempos 0 (maior concentração) e 11 a 14 h (menores concentrações), que não diferiram dos demais tempos de exposição. Com a utilização do composto 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 antagonico entre o tempo de sobrevivência da *E. coli* e o tempo de exposição aos ácidos orgânicos, associados ou não ao extrato de plantas, com porcentagens acima de 92% (Figura 1). Para Richards et al. (1995), a atividade antibacteriana do ácido p-aminobenzóico contra *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* foi comparada com a atividade de acidulantes comumente usados como: ácidos fórmico, propiônico, acético, láctico e cítrico. Segundo estes autores, a contagem de microrganismos

viáveis e a determinação de CIM indicaram que o ácido p-aminobenzoico causou maiores efeitos inibitórios do que os outros ácidos orgânicos. No referido estudo, a atividade do ácido p-aminobenzóico no crescimento dos organismos testados, em valores de pH selecionados, indicou que o ácido p-aminobenzóico foi mais ativo em pH baixo do que em pH alto. Por outro lado, Cruz-Romero et al. (2013) provaram que solubilizados nanométricos de ácidos orgânicos tiveram propriedades antimicrobianas significativamente ($P < 0,05$) maiores do que seus equivalentes não nano, demonstrando a importância da nanotecnologia e da sua aplicação prática para ampliar a atividade antimicrobiana destes compostos.

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).

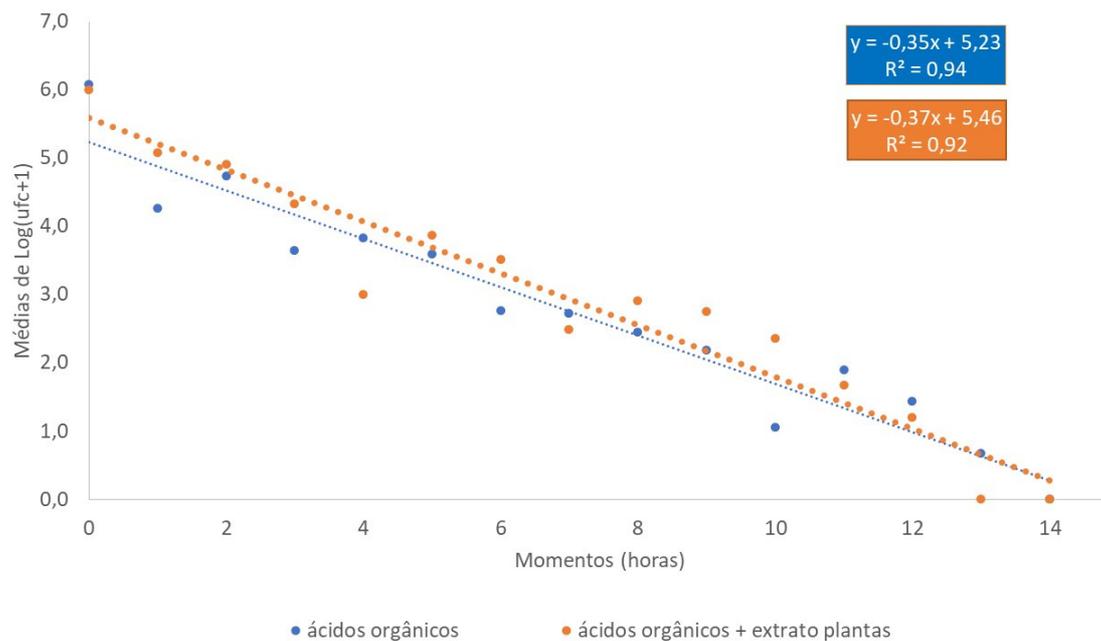


Figura 1 - Resultado da análise de regressão dos dados de UFC, em log, para *E. coli* dos grupos experimentais.

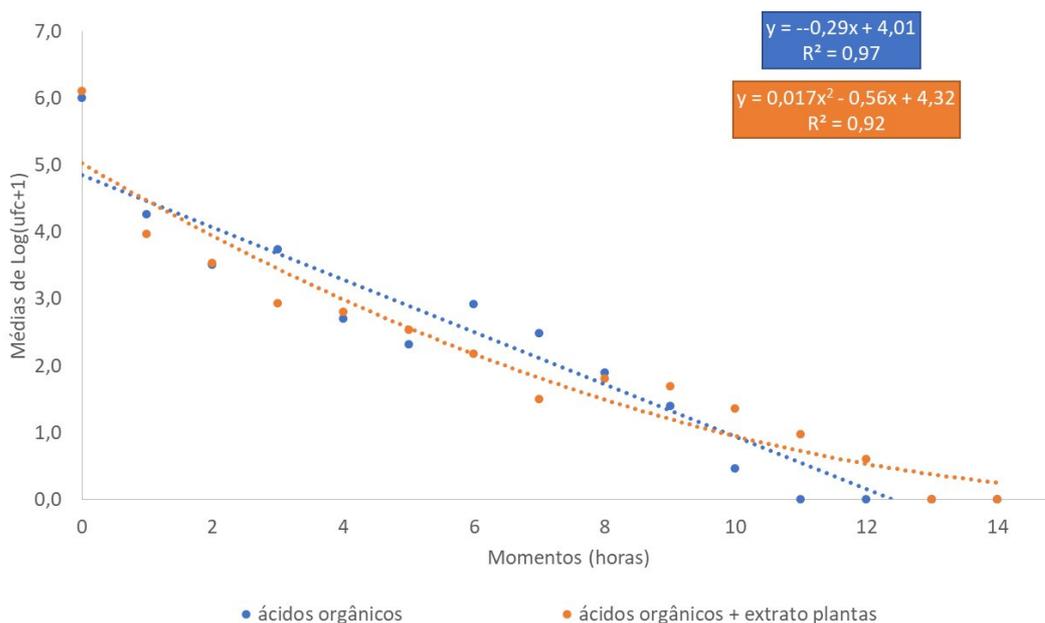


Figura 2 - Resultado da análise de regressão dos dados de UFC, em log, para *Salmonella* dos grupos experimentais

Segundo Nakai e Siebert (2003), os ácidos orgânicos ocorrem naturalmente nos alimentos e têm sido usados em muitos produtos alimentícios como conservantes porque inibem o crescimento da maioria dos microorganismos. Os ácidos comumente encontrados nos alimentos diferem muito em sua estrutura e efeitos inibitórios para diferentes bactérias, corroborando a importância de nossos achados que demonstraram a eficácia dos ácidos orgânicos no

controle *in vitro* de *E. coli* e *Salmonella Typhi*. Outros autores também descreveram o efeito de ácidos orgânicos no controle de microorganismos. O efeito dos ácidos orgânicos na inativação de *E. coli* e *Salmonella* sp. na superfície de pepinos demonstrou CIM de 1,5, 2 e 0,2% em *E. coli*, enquanto foi observada em 1, 1,5 e 1% em *Salmonella* sp. para os ácidos acético, cítrico e láctico, respectivamente. A inibição máxima da formação de biofilme foi registrada em 39,13% com

ácido láctico em *E. coli* e um mínimo de 22,53% com ácido cítrico em *Salmonella* sp. (Amrutha et al., 2017).

CONCLUSÃO

A combinação de ácidos orgânicos, associada ou não ao extrato vegetal, testados no presente trabalho, mostraram importante atividade inibitória contra *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhi. Todavia, a atividade antibacteriana dos produtos depende da concentração empregada e do tempo de exposição aos produtos e não sofreram significativa influência da presença de extratos de *Catanea sativa* e *Acacia decurrens*.

REFERÊNCIAS

- ALLAHGHADRI, T.; RASOOLI, I.; OWLIA, P.; NADOOSHAN, M.J.; GHAZANFARI, T.; TAGHIZADEH, M.; STANEH, S.D. Antimicrobial property, antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. *Journal of Food Science* 75(2): H54-H61, 2010.
- AMRUTHA, B.; SUNDAR, K.; SHETTY, P. H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial pathogenesis* v.111, 156-162, 2017.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second Informational Supplement M100-s22, Wayne, PA. 32(3):1-184, 2012.
- CORRÊA, I.M.O.; FLORES, F.; SCHNEIDERS, G.H.; PEREIRA, L.Q.; BRITO, B.G.; LOVATO, M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(2): 241-246, 2013.
- CRUZ-ROMERO, M. C.; MURPHY, T.; MORRIS, M.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control* 34(2), 393-397, 2013.
- FAVRE, B.; HOFBAUER, B.; HILDERING, K.; RYDER, N.S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *Journal of Clinical Microbiology* 17:41:48, 2003.
- FREITAS, L.S.; LOPES, D.C.; FREITAS, A.F.; CARNEIRO, J.C.; CORASSA, A.; PENA, S.M.; COSTA, L.F. Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 anos de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(4): 1711-1719, 2006.
- HUTTON, P. G., DURMIC, Z., GHISALBERTI, E. L., FLEMATTI, G. R., DUNCAN, R. M., CARSON, C. F., VERCOE, P. E. Inhibition of ruminal bacteria involved in lactic acid metabolism by extracts from Australian plants. *Animal Feed Science and Technology* v.176 , p.170-177, 2012.
- KUREKCI, C., BISHOP-HURLEY S.L., VERCOE, P.E. DURMIC, Z. AL JASSIM, R.A.M. MCSWEENEY, C.S. Triagem de plantas australianas quanto à atividade antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research*, 26 (2012), pp. 186-190.
- LOPES, E.S.; MACIEL, W.C.; TEIXEIRA, R.S.C.; ALBUQUERQUE, A.H.; VASCONCELOS, R.H.; MACHADO, D.N.; BEZERRA, W.G.A.; SANTOS, I.C.L. Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psitacíformes: relevância em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2016; 83: 1-10.
- NAKAI, S. A.; SIEBERT, K. J. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 86(3), 249-255, 2003.
- ORTEGA, Y., BARREIRO S, F.; CASTRO S, G. ; HUANCARÉ P, K. ; MANCHEGO S, A ; BELO, MAA ; FIGUEIREDO, M.A.P ; MANRIQUE, W.G ; SANDOVAL, H. N. . Estreptococos beta-hemolítico en tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en Sullana, Piura - Perú. *Revista MVZ Cordoba*, v. 22, p. 5653, 2017.
- ORTEGA Y.; BARREIRO, S. F., BUENO M., H., HUANCARÉ P., K. OSTOS A. H. MANCHEGO, S. A., FIGUEIREDO, M.A.P.; MANRIQUE, W; BELO, M.A.A., SANDOVAL C.N. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports*, v. 4, p. 74-79, 2016.
- RAMOS, K.; ANDREANI JUNIOR, R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Óleos essenciais e vegetais no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.18, n.2, supl. I, p.605-612, 2016.
- RICHARDS, R. M. E.; XING, D. K. L.; KING, T. P. Activity of p-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. *Journal of applied bacteriology*, 78(3), 209-215, 1995.
- RODRÍGUEZ-ANGELES G. Principais características e diagnóstico dos grupos patogênicos de *Escherichia coli*. *Saúde pública México*. 2002; 44(5).
- RONDISVALLE, S.; LISSANDRELL, E.; FUOCHI, V.; PETRONIO, G.P.; STRAQUADANIO, C.; CRASCI, L.; PANICO, A.; MILLITO, M.; COVA, A.M.; TEMPERA, G.; FURNERI, P.M. Antioxidant and antimicrobial properties of *Castanea sativa* Miller chestnut honey produced on Mount Etna (Sicily). *Natural Product Research*. 2017.
- SYLVESTER, P.W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Method in Molecular Biology* 716:157-168, 2011.