



Genes de resistência a cefalosporinas e atividade antibacteriana de *Pereskia aculeata* em *Escherichia coli* ESBL de frangos de corte

Cefalosporin resistance genes and antibacterial activity of *Pereskia aculeata* against ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from broiler chickens

Rafaela Galves Ferreira¹ , Taniara Suelen Mezalira¹ , Dérick de Almeida Marchi^{*1} , Zilda Cristiani Gazim¹ , Gabriela Catuzo Canônico Silva¹ , Suelen Pereira Ruiz¹ , Jorcilene dos Santos Silva¹ , Renata Katsuko Katayama Kobayashi² , Maísa Fabiana Menck-Costa² , Beatriz Cervejeira Bolanho Barros³ , Dayane Lilian Gallani Silva³ , Lucas de Almeida Reati¹ , Luciana Kazue Otutumi¹

1 Universidade Paranaense (Unipar), Umuarama, Paraná, Brasil

2 Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil

3 Universidade Estadual de Maringá (UEM), Umuarama, Paraná, Brasil

*autor correspondente: derick.marchi@edu.unipar.br

Recebido: 11 de setembro de 2024. Aceito: 09 de junho de 2025. Publicado: 22 de setembro de 2025. Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: A resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* tem contribuído para a busca por produtos alternativos ao seu uso, como os extratos vegetais. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil dos genes de resistência a cefalosporinas em isolados de *E. coli* com fenótipo de produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), a composição fenólica e a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Pereskia aculeata* contra cepas isoladas de frangos de um dia de vida e em crescimento. Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico de *P. aculeata*, foram selecionados isolados de *E. coli* que apresentaram perfil ESBL em uma das origens (pintos de um dia ou frangos em crescimento). Os genes de resistência *bla*_{CTX-M-1'}, *bla*_{CTX-M-2'}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{SHV} foram detectados com maior percentual em isolados de frangos em crescimento. O extrato de *P. aculeata* apresentou diversos compostos fenólicos, sendo o ácido málico e a rutina os predominantes. A determinação da CIM foi possível em apenas dois isolados de *E. coli*, um do Aviário A (frangos em crescimento) e outro do Aviário B (pintos de um dia). Em ambos os casos, a CIM foi de 20 mg/mL. Na cepa ATCC 25922 de *E. coli*, utilizada como cepa padrão para a avaliação do teste, a CIM foi de 20 mg/mL. Conclui-se que isolados de *E. coli* provenientes de pintos de um dia e frangos em crescimento carregam genes de resistência a cefalosporinas, e que não há diferença na CIM do extrato etanólico de *P. aculeata* Mill. quando comparadas cepas com perfil fenotípico ESBL àquelas que não apresentam esse perfil, demonstrando a necessidade de estudos adicionais com plantas com potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: *bla*_{CTX-M-1'}; concentração inibitória mínima; concentração bactericida mínima; *Ora-pro-nóbis*.

Abstract: Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains has contributed to the search for alternative antimicrobial products, such as plant extracts. The objective of this study was to evaluate the profile of cephalosporin-resistance genes in *E. coli* isolates with an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production phenotype, and the phenolic composition and antibacterial activity of the ethanolic extract

of *Pereskia aculeata* against strains isolated from 1-day-old and growing chickens. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the ethanolic extract of *P. aculeata*, *E. coli* isolates that exhibited an ESBL profile when isolated from either 1-day-old chicks or growing chickens were selected. The resistance genes $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-8}$, and bla_{SHV} were detected in a higher percentage of isolates from growing chickens. The *P. aculeata* extract was found to contain several phenolic compounds, with malic acid and rutin being predominant. Determination of MIC was only possible for two *E. coli* isolates (one from Broiler house A (growing chickens) and the other from Broiler house B (1-day-old chicks) - and for the standard strain *E. coli* ATCC 25922; in all cases, the MIC was 20 mg/mL. These findings indicate that *E. coli* isolates from both age groups carried cephalosporin-resistance genes and exhibit similar susceptibility to the *P. aculeata* extract, regardless of ESBL phenotype. These results highlight the need for further research into plant-based antimicrobials.

Key-words: $bla_{CTX-M-1}$; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; *Ora-pro-nóbis*.

1. Introdução

A avicultura é uma atividade econômica de destaque tanto em nível nacional quanto internacional. A produtividade na avicultura pode ser aumentada por meio de melhorias em diversos aspectos, dentre os quais estão genética, nutrição, manejo de produção, ambiente (instalações) e saúde ⁽¹⁾. A criação de frangos de corte em alta densidade é uma estratégia que visa a aumentar a produtividade sem gerar despesas adicionais para os produtores ⁽²⁾. No entanto, a criação intensiva em alta densidade pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças ⁽³⁾, especialmente quando ocorrem falhas no manejo dos animais. Isso torna necessário o uso de aditivos, como melhoradores de desempenho, para aumentar as taxas de crescimento, a eficiência alimentar e reduzir a mortalidade ⁽⁴⁾.

O surgimento da resistência antimicrobiana tem motivado mudanças nas abordagens da avicultura. Desde 2010, a Aliança Tripartite formada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), juntamente à Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) e à Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), assumiu um compromisso firme para combater a resistência antimicrobiana, a fim de mitigar riscos sob a perspectiva da Saúde Única ⁽⁵⁾. Dentre os diversos patógenos de importância na avicultura, a *Escherichia coli* se destaca por seu papel no desenvolvimento de diversas infecções, podendo atuar como agente primário ou secundário ⁽⁶⁾. Fatores de risco associados ao surgimento da resistência antimicrobiana em cepas patogênicas de *E. coli* incluem o uso de antimicrobianos aliado a práticas inadequadas de higiene, o que leva à pressão de seleção para cepas de *E. coli* patogênicas para aves (APEC) ⁽⁷⁾.

Hu *et al.* ⁽⁸⁾ relataram que cepas APEC causam doenças respiratórias e sistêmicas graves em várias espécies de aves, representando problemas significativos para a indústria avícola, além de desafios associados à segurança alimentar e ao bem-estar animal. Além disso, as cepas APEC têm sido associadas à presença de genes de resistência aos β -lactâmicos ⁽⁹⁾, o que configura um problema de saúde única, sendo os genes mais comumente detectados em cepas isoladas de animais infectados pertencentes às famílias bla_{TEM} , bla_{SHV} e bla_{CTX-M} ⁽¹⁰⁾.

Esses desafios têm motivado a busca por aditivos, como os extratos vegetais, que possam servir como alternativas aos antimicrobianos. No Brasil, as espécies *P. aculeata* e *P. grandifolia* são popularmente conhecidas como Ora-pro-nóbis, e suas folhas são consumidas como alimento em algumas regiões devido ao alto valor nutricional, que incluem minerais e proteínas ⁽¹¹⁾. Muitos estudos avaliaram as propriedades antioxidantes das folhas de Ora-pro-nóbis ⁽¹²⁻¹³⁾, no entanto, são necessários novos estudos para ratificar seus efeitos antimicrobianos.

Ainda assim, há evidências de que o extrato de *P. aculeata* apresenta potencial antimicrobiano significativo, como demonstrado por Pimenta *et al.* ⁽¹⁴⁾, que observaram resultados positivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra alguns gêneros fúngicos específicos. Garcia *et al.* ⁽¹⁵⁾ também observaram atividade antimicrobiana dos extratos de Ora-pro-nóbis contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, essa última resistente à metilina, além de bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, destacando a ação de amplo espectro do extrato.

Segundo Moraes *et al.* ⁽¹⁶⁾, a presença de compostos fenólicos nas folhas de *P. aculeata* explica sua atividade antioxidante. Nessa pesquisa, verificou-se que diferenças no método de extração influenciam essa atividade, sendo observada maior incidência no extrato no qual foi utilizada acetona como solvente. Além disso, ao realizar uma análise bibliométrica de artigos que discutem a atividade antioxidante, Agostini-Costa *et al.* ^(12, 17) identificaram que não apenas os fenólicos, mas também outras substâncias, como carotenoides, estão associadas à atividade antioxidante.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi detectar genes codificadores de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (*bla*_{CTX}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}) em cepas de *E. coli* com perfil fenotípico ESBL, isoladas de pintos de um dia de vida e frangos em crescimento, além de determinar a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *P. aculeata* Mill. nessas cepas.

2. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paranaense (Unipar), sob o número de protocolo 40065/2023. O estudo foi conduzido utilizando isolados de *E. coli* oriundos de amostras de swab cloacal de pintos de um dia e, posteriormente, do mesmo lote quando os frangos estavam na fase de crescimento (28 dias de idade). As amostras foram coletadas por médicos veterinários utilizando swab uretral umedecido em meio BHI (Brain Heart Infusion), realizando compressão com movimento rotatório na cloaca das aves.

2.1 Coleta e processamento das amostras

As amostras (n=20) foram coletadas em dois aviários (A e B), localizados na região noroeste do estado do Paraná (dez unidades por aviário). Cada amostra foi composta por um pool de dez aves. Imediatamente após a coleta, as amostras foram armazenadas em meio BHI, refrigeradas e processadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense. Os isolados de *E. coli* foram identificados por meio de testes bioquímicos, incluindo ágar lisina ferro, citrato de Simmons, meio MIO (motilidade, indol, ornitina), TSI (Triple Sugar Iron) e ureia, conforme metodologia descrita por Quinn *et al.* ⁽¹⁸⁾ em estudo anterior.

Os isolados foram submetidos ao teste de disco-duplo sinérgico para identificação de cepas produtoras de ESBL, de acordo com a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ⁽¹⁹⁾. Resumidamente, discos contendo cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO) e aztreonam (ATM) foram posicionados a 20 mm de um disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico (AMC). Os isolados foram considerados produtores de ESBL com base na formação de uma zona de inibição irregular (zona fantasma) entre o disco composto e o disco de um dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico de Ora-pro-nóbis (*P. aculeata* Mill.) foram determinadas apenas para os isolados de *E. coli* que apresentaram perfis ESBL ou variações de perfil (positivo-negativo/negativo-positivo) entre as origens (pinto de um dia ou frango em crescimento), totalizando oito isolados do aviário A e seis isolados do aviário B. A cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

2.2 Análise molecular da presença de genes ESBL ou de resistência a cefalosporinas

A partir das amostras isoladas, o DNA foi extraído por fervura a 100 °C por 10 minutos, seguido de centrifugação e retirada do sobrenadante para a pesquisa dos genes *bla*_{CTX}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (20-21) (Tabela 1). A PCR foi realizada utilizando o Promega PCR Master Mix (Promega, EUA), e o material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizado por coloração com Gel Red (Biotium). A presença de uma banda amplificada na região específica indicou resultado positivo.

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação e sequenciamento de DNA para a detecção da presença de genes ESBL.

Alvo	Gene	Par de bases	Sequência do oligonucleotídeo (5' - 3')	Referência
<i>bla</i> _{ESBL}	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	415	F- AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC R- AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	19
	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	552	F- CGA CGC TAC CCC TGC TAT T R- CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	
	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	666	F- TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC R- AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	
	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	205	F- CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG R- ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	
	<i>bla</i> _{CTX-M25}	327	F- GCA CGA TGA CAT TCG GG R- AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	
	<i>bla</i> _{TEM}	800	F- CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C R- CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C	20
	<i>bla</i> _{SHV}	713	F- CAC TCA AGG ATG TAT TGT G R- TTA GCG TTG CCA GTG CTC G	21

2.3 Extrato etanólico de *P. aculeata*

As folhas de Ora-pro-nóbis (*P. aculeata* Mill.) foram coletadas no Horto Medicinal da Universidade Paranaense, localizado na latitude 23°46'10.9"S e longitude 53°16'39.6"W, na cidade de Umuarama, estado do Paraná, no início da manhã, durante o verão. O material botânico de Ora-pro-nóbis foi depositado no Herbário do Horto Medicinal sob o registro nº 88 e foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o registro nº AA63755.

Após a coleta, as folhas foram selecionadas, lavadas e secas em estufa de ar forçado a 35 °C por 15 dias. Posteriormente, o material foi triturado até atingir granulometria de 850 µm. O pó foi submetido à maceração dinâmica com renovação do solvente (álcool etílico cereal 70° GL) a cada dois dias, por aproximadamente vinte dias, na proporção de 50 g para 1 L de solvente. A cada renovação do solvente, o material foi filtrado com gaze e funil.

O filtrado foi armazenado e, posteriormente, concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Tecnal TE-211) a 35 °C até obtenção do extrato bruto. Em seguida, o extrato foi armazenado congelado a -20 °C até seu uso para determinação da composição fenólica, CIM e CBM.

2.4 Análise da composição fenólica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS)

O extrato foi ressuspendido em metanol (grau MS) e purificado com solução de hidróxido de bário 1M e sulfato de zinco a 5%. Em seguida, foi filtrado por uma membrana hidrofóbica de PVDF (poros de 0,45 µm e diâmetro de 25 mm) e analisado por HPLC. Os compostos fenólicos foram detectados utilizando HPLC (Shimadzu, modelo NEXERA X2) acoplado a um detector de massas (MS/MS, Shimadzu, modelo 8050) e uma coluna Shimadzu C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm).

Para a eluição, foi utilizada um gradiente linear composto por água Milli-Q (A) e metanol (B) conforme segue: 1-9 min (20% B), 10-15 min (40% B) e 16-30 min (10% B). A temperatura foi fixada em 35 °C e o volume de injeção foi de 1 µL. O detector MS/MS foi operado em modo de varredura por 15 minutos.

A análise da presença de compostos fenólicos foi realizada com o software Insight (Shimadzu), com base nas curvas analíticas (10-250 µg/L) dos seguintes compostos: catecol, morina, isovanilina, ácido gálico, quercetina, hidroxibenzaldeído, naringenina, siringaldeído, ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido salicílico, vanilina, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzóico, naringina, ácido p-cumárico, ácido cafeico, aldeído coníferílico, ácido sinápico, siringaldazina, catequina, sinapaldeído, luteolina, rutina, teobromina, epicatequina, baicalina, crisina, ácido quínico, ácido málico, kaempferol, cumarina, cafeína, ácido resorcílico, ácido nicotínico e ácido fumárico ⁽²²⁾.

2.5 Determinação da CIM do extrato etanólico de *P. aculeata*

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços com caldo Mueller–Hinton, conforme CLSI ⁽²³⁾, com modificações para compostos naturais. O extrato foi dissolvido em Tween 80 e avaliado em concentrações de 20 a 0,039 mg/mL. A suspensão bacteriana foi padronizada em solução salina (0,85%) segundo a escala de McFarland 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e posteriormente diluída na proporção de 1:10 ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL).

Após microdiluição seriada (1:2) do extrato, foram adicionados 50 µL ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL) de cada inóculo. Em seguida, as microplacas foram incubadas por 24h a 37 °C, e a leitura foi feita para determinação da CIM utilizando o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio como indicador de crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato (mg/mL) que inibiu o crescimento bacteriano visível, conforme indicado pelo indicador de crescimento ⁽²⁴⁾. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6 Determinação da CBM do extrato etanólico de *P. aculeata*

A CBM foi determinada pela transferência de 5 µL da cultura de cada poço da placa usada na determinação da CIM para uma placa de ágar Mueller–Hinton utilizando um replicador, seguida de incubação a 36 °C por 24 h. A CBM foi determinada com base na ausência de crescimento bacteriano visível após o período de incubação ⁽²⁵⁾.

2.7 Análise dos dados

A análise descritiva dos dados foi realizada por meio do cálculo das frequências absolutas (n) e relativas (%).

3. Resultados e discussão

No presente estudo, nove de dez isolados (90%) de *E. coli* foram identificados em pintos de um dia provenientes do Aviário A. Paralelamente, seis de dez (60%) foram identificados no pool do Aviário B. Entre esses isolados, a maior porcentagem de cepas com perfil ESBL foi observada no Aviário B (Figura 1). Quando os pintos atingiram 28 dias de idade, novas amostras de swab cloacal foram coletadas dos dois aviários. Nesse caso, 100% dos isolados foram identificados com *E. coli* (Figura 1). Dentre esses isolados, 50% de cada um dos aviários apresentaram perfil ESBL. Somente os isolados com perfil ESBL foram avaliados quanto à presença dos genes *bla*_{CTX-M'}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}.

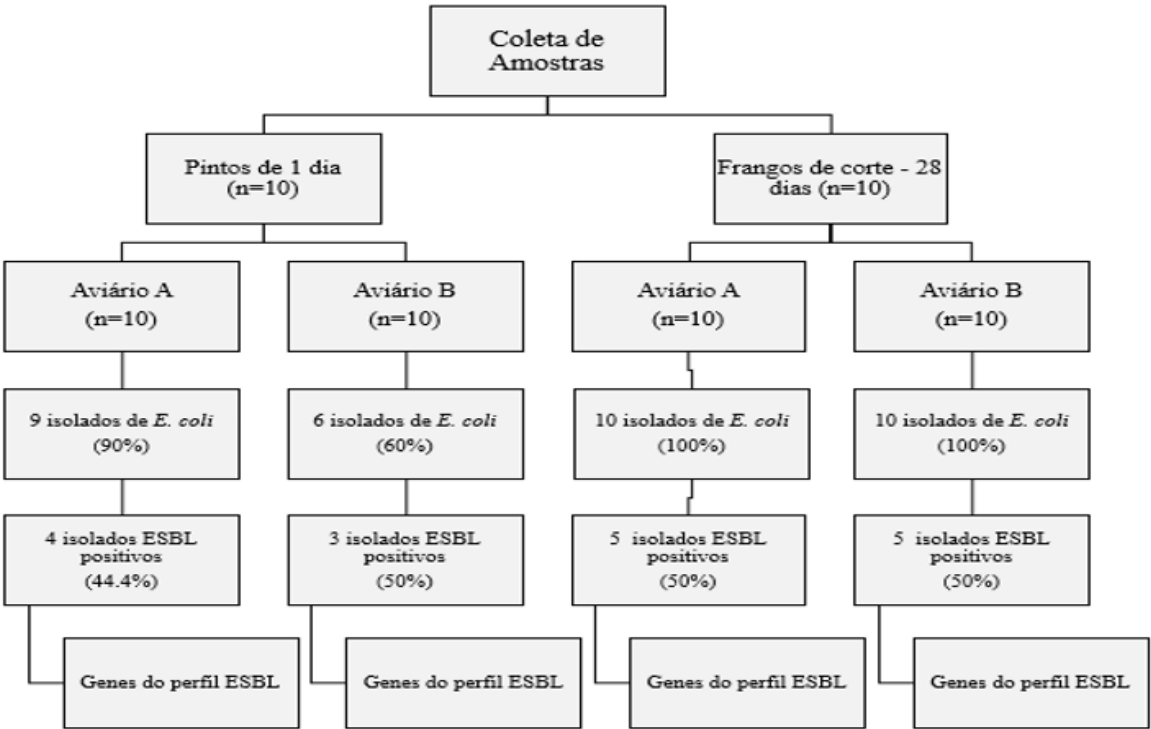


Figura 1. Fluxograma dos resultados do isolamento de cepas de *E. coli*, perfil fenotípico ESBL e isolados selecionados para análise do perfil genotípico ESBL (*bla*_{CTX-M'}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}).

Os isolados do Aviário A apresentaram menor número de cepas com perfil fenotípico ESBL (44,4%) em pintos de um dia (Figura 1). Essa porcentagem aumentou numericamente nos isolados de frangos em crescimento (50%). Em contraste, os isolados do Aviário B apresentaram 50% de perfil fenotípico ESBL já na fase de pintos.

Segundo Dame-Korevaar *et al.* ⁽²⁶⁾, os frangos são importantes reservatórios de cepas bacterianas produtoras de ESBL. Em sua revisão, cujo objetivo foi descrever possíveis vias de propagação de cepas produtoras de ESBL, os autores identificaram rotas de transmissão vertical (por contaminação do ovário ou vagina, ou da casca do ovo) na incubadora, transmissão horizontal entre aviários e transmissão horizontal indireta entre galpões por meio do contato com seres humanos, outros animais, equipamentos e o ambiente.

Considerando que as amostras obtidas de pintos de um dia foram coletadas no momento do desembarque das aves na granja, presume-se que a contaminação dessas aves com cepas de *E. coli* com perfil ESBL possa ter ocorrido de forma vertical, durante a permanência dos ovos na incubadora ou mesmo no momento da eclosão. Deve-se, ainda, destacar que o aumento do percentual de cepas produtoras de ESBL quando os animais atingiram 28 dias de idade (fase de crescimento) pode ser explicado por contaminação ambiental, uma vez que estudos relataram a presença de cepas produtoras de ESBL na cama ou ambiente de criação ^(27,28), em moscas ⁽²⁹⁾ e na água de bebida ⁽³⁰⁾ das aves.

Por outro lado, Dierikx *et al.* ⁽³¹⁾ avaliaram a presença de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL utilizando o método fenotípico e confirmaram seus achados por meio de método genotípico em granjas de frangos de corte no Reino Unido e na Irlanda. Os autores observaram que a prevalência de aves positivas para ESBL aumentou na primeira semana, de 0 a 24% para 96 a 100%, independentemente do uso de antimicrobianos, e permaneceu em 100% até o abate, corroborando o aumento de cepas positivas para ESBL em frangos em crescimento em comparação aos pintos de um dia, conforme observado no Aviário A.

Dentre os isolados com perfil fenotípico ESBL submetidos à análise do perfil genotípico de resistência, 100% e 66,6% dos isolados de pintos de um dia dos Aviários A e B, respectivamente, apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-1'}, prevalecendo em relação aos genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-8}. Entretanto, nas cepas de *E. coli* isoladas de frangos em crescimento, observou-se maior percentual para os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-2'}, que estiveram presentes em proporções iguais nos isolados dos Aviários A e B (80% e 60%, respectivamente). Nenhuma das cepas de *E. coli* isoladas de frangos de corte do Aviário A apresentou o gene *bla*_{CTX-M-8} (Tabela 2). Destaca-se, ainda, que nenhuma das cepas de *E. coli* de ambas as granjas apresentou os genes *bla*_{CTX-M-9'}, *bla*_{CTX-M-25} e *bla*_{TEM}.

Kim *et al.* ⁽⁹⁾, ao avaliarem a presença de genes de resistência a β -lactâmicos em isolados de *E. coli* APEC provenientes de lesões hepáticas de frangos com colibacilose na Coreia do Sul, detectaram os genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-15} em 29,1%, 5,1% e 3,8% dos isolados, respectivamente. Salienta-se que a prevalência do gene *bla*_{CTX-M-1} no estudo de Kim *et al.* foi inferior à observada no presente estudo, apesar de os isolados aqui avaliados terem sido obtidos de lotes de frangos de corte clinicamente saudáveis.

Ilyas *et al.* ⁽³⁰⁾ detectaram os genes *bla*_{CTX-M'}, *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{TEM} em 71,2%, 67,5% e 62,2%, respectivamente, das cepas de *E. coli* isoladas de cecos de aves provenientes de mercados de aves vivas em diferentes regiões de Islamabad e Rawalpindi, no Paquistão, o que corrobora parcialmente os percentuais encontrados no presente estudo. Tseng, Liu e Liu ⁽¹⁰⁾ relataram que os genes mais comumente detectados em animais pertencem às famílias *bla*_{TEM'}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M'}; entretanto, no presente trabalho, o gene *bla*_{TEM} não foi detectado.

Tabela 2. Frequência de genes de resistência a cefalosporinas em isolados de *E. coli* de pintos de um dia e frangos em crescimento, e a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de *P. aculeata* Mill.

ID	Aviário	Perfil ESBL	Perfil genético de pintos de um dia					Perfil ESBL	Perfil genético de frangos em crescimento				
			<i>bla</i> _{CTX}			<i>bla</i> _{SHV}	CIM		<i>bla</i> _{CTX}			<i>bla</i> _{SHV}	CIM
			M-1	M-2	M-8				M-1	M-2	M-8		
1	A	+	+	+	-	-	>20	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20
2	A	+	+	-	+	-	>20	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20
3	A	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20	+	-	+	-	-	>20
5	A	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20	+	+	+	-	-	>20
6	A	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20	+	+	+	-	-	>20
7	A	+	+	+	-	+	>20	+	+	-	-	+	20
8	A	+	+	+	-	-	>20	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20
10	A	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20	+	+	+	-	-	>20
TOTAL			4/4 (100%)	¾ (75%)	1/4 (25%)	¼ (25%)			4/5 (80%)	4/5 (80%)	0 (0%)	1/5 (20%)	
1	B	+	+	-	-	-	>20	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20
2	B	+	-	+	-	+	>20	+	+	-	-	+	>20
3	B	-	N/A	N/A	N/A	N/A	20	+	+	+	-	-	>20
8	B	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20	+	+	-	+	+	>20
9	B	+	+	-	+	-	>20	+	-	+	+	-	>20
10	B	-	N/A	N/A	N/A	N/A	>20	+	-	+	-	-	>20
TOTAL			2/3 (66.6%)	1/3 (33.3%)	1/3 (33.3%)	1/3 (33.3%)			3/5 (60%)	3/5 (60%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)	

ID: Identificação; CIM: concentração inibitória mínima; N/A: não avaliado; + = positivo; - = negativo.

Segundo Kim *et al.* ⁽⁹⁾, a variedade de genes de resistência a β -lactâmicos identificada, associada à presença desses genes em plasmídeos, facilita a transmissão entre bactérias, ressaltando a necessidade de monitoramento contínuo para rastrear cepas de *E. coli* patogênicas para aves em granjas avícolas. Koga *et al.* ⁽³²⁾ também enfatizaram que a produção de ESBL confere multirresistência e representa risco à saúde, uma vez que está frequentemente associada a plasmídeos, facilitando a transmissão entre bactérias de diferentes hospedeiros e sugerindo riscos zoonóticos.

A determinação da CIM foi possível apenas para dois isolados de *E. coli*, um proveniente do aviário A, isolado de frangos em crescimento, e outro do aviário B, isolado de pintos de um dia. Em ambos os casos, a CIM do extrato foi de 20 mg/mL. Adicionalmente, a CIM do extrato perante a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 também foi de 20 mg/mL.

Garcia *et al.* ⁽¹⁵⁾ confirmaram a atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *P. aculeata* diante de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e Gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). De forma semelhante, Colacite *et al.* ⁽³³⁾ avaliaram os extratos metanólico e etanólico das folhas de Ora-pro-nóbis e observaram que o extrato metanólico inibiu o crescimento de cepas de *K. pneumoniae*; no entanto, não observaram inibição perante as cepas de *E. coli*.

Essas diferenças na atividade antimicrobiana podem estar relacionadas aos compostos bioativos extraídos das plantas. Neste estudo, foram detectados catorze compostos fenólicos, sendo o ácido málico o que apresentou maior concentração, seguido pela rutina e pelo ácido fumárico (Tabela 3).

Tabela 3. Média \pm desvio padrão da concentração (mg/100g) dos compostos presentes no extrato etanólico das folhas de *P. aculeata* Mill. detectados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Compostos	Média \pm desvio padrão (mg/100g)
Ácido cafeico	0.56 \pm 0.02
Ácido clorogênico	0.13 \pm <0.01
Ácido ferúlico	1.17 \pm 0.05
Ácido fumárico	4.32 \pm 0.10
Ácido málico	46.12 \pm 0.99
Ácido nicotínico	1.73 \pm 0.05
Ácido <i>p</i> -cumárico	1.65 \pm 0.07
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	1.33 \pm 0.08
Ácido protocatecuico	1.98 \pm 0.01
Ácido resorcílico	1.95 \pm <0.01
Ácido siríngico	0.43 \pm 0.02
Ácido vanílico	1.10 \pm 0.02
Isovanilina	1.68 \pm 0.07
Rutina	20.66 \pm 0.98

Maciel *et al.* ⁽³⁴⁾ relataram a presença de cumarinas, compostos fenólicos, flavonoides e taninos no extrato aquoso de *P. aculeata*. Garcia *et al.* ⁽¹⁵⁾ identificaram a presença de ácido cafeico, ácido caftarico, quercetina-3-O-rutinosídeo, kaempferol e isorhamnetina-O-pentosídeo-O-rutinosídeo no extrato hidroetanólico de *P. aculeata*, demonstrando variações nos compostos bioativos isolados.

Macedo *et al.* ⁽³⁵⁾ observaram maiores concentrações de ácido clorogênico (35-52 mg 100g⁻¹) e ácido cafeico (~3 mg 100g⁻¹) em extratos hidroetanólicos das folhas de *P. aculeata*. Nesse estudo, a CIM para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* foi determinada em 50 mg/mL, e para *E. coli* não foi possível

determinar a CIM ⁽³⁵⁾, o que corrobora os achados do presente estudo. Dentre os compostos bioativos avaliados, Wong *et al.* ⁽³⁶⁾ detectaram a presença de quercetina no extrato aquoso de outra espécie, *P. bleo*; entretanto, assim como neste estudo, não detectaram a presença de ácido gálico e catequina. Esses estudos sugerem que há variações no conteúdo fenólico dos extratos de *P. aculeata*, e o presente estudo contribui para a elucidação dessa composição, uma vez que diversos compostos fenólicos não previamente relatados na literatura para esta espécie foram detectados.

A concentração máxima do extrato avaliada neste estudo foi de 20 mg/mL. Pandini *et al.* ⁽³⁷⁾ classificaram concentrações de extrato entre 12,5-25 mg/mL como moderadamente ativas, demonstrando que é possível avaliar concentrações mais elevadas do extrato. Ao comparar as cepas para as quais foi possível a determinação da CIM, apenas uma delas apresentou perfil ESBL (Tabela 2), demonstrando que novos estudos são necessários para verificar a possível relação entre bactérias com perfil de resistência e diferentes genes associados à resistência.

Na medicina veterinária, infecções por *E. coli* são prevalentes na rotina de profissionais que atuam com animais de produção ⁽³⁸⁾. Estudos demonstraram que cepas de origem aviária podem causar infecções em modelos experimentais utilizando mamíferos, reforçando assim a tese do potencial zoonótico ⁽³⁹⁾. No entanto, não há consenso quanto aos riscos à saúde associados ao manuseio de produtos de origem avícola ou ao seu consumo, o que reforça a necessidade de estudos adicionais ⁽³⁸⁾.

4. Conclusão

Os resultados deste estudo indicaram a presença de genes de resistência em isolados de *E. coli* produtores de ESBL provenientes de frangos de corte, validando a crescente preocupação com a disseminação de bactérias multirresistentes em granjas avícolas. Além disso, o extrato etanólico de *P. aculeata* apresentou atividade antibacteriana limitada diante desses isolados, sugerindo a necessidade de aprimoramento nos métodos de extração ou sua utilização em combinação com outros compostos. Estudos futuros devem investigar diferentes técnicas de extração, formulações e concentrações, bem como realizar ensaios *in vivo*, a fim de ampliar o potencial uso de aditivos naturais como alternativas viáveis aos agentes antimicrobianos convencionais.

Material suplementar

[Resumo gráfico](#) (disponível apenas na versão eletrônica).

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados estarão disponíveis mediante solicitação.

Contribuições do autor

Conceitualização: L. K. Otutumi e T. S. Mezalira. Curadoria de dados: L. K. Otutumi e Z. C. Gazim. Análise formal: L. K. Otutumi. Aquisição de financiamento: L. K. Otutumi. Gestão do projeto: R. G. Ferreira, T. S. Mezalira e D. A. Marchi. Metodologia: L. K. Otutumi, Z. C. Gazim, R. K. K. Kobayashi e B. C. B. Barros. Supervisão: L. K. Otutumi, S. P. Ruiz e Z. C. Gazim. Investigação: T. S. Mezalira, R. G. Ferreira, D. A. Marchi, G. C. C. Silva, J. S. Silva, D. L. G. Silva, L. A. Reati e M. F. Menck-Costa. Visualização: R. G. Ferreira, L. K. Otutumi e S. P. Ruiz. Redação (versão original): R. G. Ferreira. Redação (revisão e edição): D. A. Marchi, L. K. Otutumi e B. C. B. Barros.

Referências

01. Sandi, A. J. Embrapa Suínos e Aves, dez. 2021 Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/frango-de-corte/producao/gestao-unidade-produtora/desempenho-economico>
02. Andrade L, Freitas ES. Efeitos da densidade populacional sobre o desempenho produtivo em frangos de corte em diferentes tipos de aviários. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG. 2018; 1(1): 185-192. Disponível em: <https://themaetscientia.fag.edu.br/index.php/ABMVFAG/article/view/264>
03. Dalólio FS, Moreira J, Valadares LR, Nunes PB, Vaz DP, Pereira HJ, Cruz PJ. Aditivos alternativos ao uso de antimicrobianos na alimentação de frangos de corte. Revista. Brasileira Agropecuária Sustentável. 2015; 5 (1): 86-94. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21206/rbas.v5i1.281>
04. Teillant A, Laxminarayan R. Economics of antibiotic use in US swine and poultry production. Choices. 2015; 30 (1): 1-11.
05. Lentz SAM. Atualização sobre uso racional de antimicrobianos e boas práticas de produção. Porto Alegre: OPAS/MAPA, 2022. 50p.
06. Maiorki KM, Fukumoto NM. (2021). Colibacilose aviária: revisão de literatura. Brazilian Journal of Development. 2021; 7 (10): 99696-99707. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n10-332>
07. Ibrahim RA, Cryer TL, Lafi SQ, Basha EA, Good L, Tarazi YH. Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization, and the associated risk factors. BMC Veterinary Research. 2019; 15 (159): 1-16. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-019-1901-1>
08. Hu J, Afayibo DJA, Zhang B, Zhu H, Yao L, Guo W, Wang S. Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Frontiers Microbiology. 2022; 13: 1-10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.1049391>
09. Kim YB, Yoon MY, Ha, JS, Seo KW, Noh EB, Son SH, Lee YJ. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. Poultry Science. 2020; 99 (2): 1088-1095. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.047>
10. Tseng CH, Liu CW, Liu PY. Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) producing bacteria in animals. Antibiotics. 2023; 12: 661. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12040661>
11. Santos LS, Queiroz CRAA, Melo CMT. Cactáceas do gênero *Pereskia*: composição nutricional e algumas aplicações. ForScience. 2021; 9 (2): e00702. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.29069/forscience.2021v9n2.e702>
12. Agostini-Costa TS, Wondracek DC, Rocha WDS, Silva DBD. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. Revista Brasileira Fruticultura. 2012; 34(1): 234-238. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000100031>
13. Sousa RMF, Lira CS, Rodrigues AO, Moraes SAL, Queiroz CRAA, Chang R, Aquino FJ, Muñoz RAA, Oliveira A. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pró-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos in vitro. Bioscience. Journal. 2014; 30 (1): 448-457.
14. Pimenta PC, Belo TCA, Vanzele PAR, Nasser TF, Santos HCAS, Bani GMAC. Avaliação da capacidade antimicrobiana do óleo essencial de *Pereskia aculeata*: interação com microrganismos encontrados em jalecos de profissionais de saúde. Brazilian Journal of Development. 2020; 6 (6):40046-40058. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-514>
15. Garcia JAA, Corrêa RCG, Barros L, Pereira C, Abreu RMV, Alves MJ, Calhelha RC, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. Food Chemistry. 2019; 294: 302-309. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.074>
16. Moraes TV, De Souza MRA, Souza JL, Simão CBR, Moreira RFA. Potencial antioxidante da espécie *Pereskia aculeata* Miller: uma análise bibliométrica. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research. 2019; 29 (1): 79-85.
17. Agostini-Costa TS, Pessoa GKA, Silva DB, Gomes IS, Silva JP. Carotenoid composition of berries and leaves from a Cactaceae–*Pereskia* sp. Journal of Functional Foods. 2014; 11: 178-184. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.015>
18. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. (2015). Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed.
19. CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 18th Informational Supplement. CLSI document M100-D18. Wayne, PA, 2008.
20. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006; 57 (1): 154-155. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki412>
21. Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, Torres C. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007; 60 (5): 1137-1141, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm316>

22. Damião VHB, Assunção CT, Correia DCC, Silva LS, Costa ACPR, Coelho EMP. Diferentes métodos de extração para obtenção de metabólitos na planta jovem nim (*Azadirachta indica*) por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Observatório de la Economía Latinoamericana*, 2024; 22: 4372–4386. Disponível em: <https://doi.org/10.55905/oelv22n1-231>
23. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 7th. Approved standard M7-A10, 2015.
24. Bona EAMD, Pinto FGDS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura ACD. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2014; 81 (3): 218-225. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001192012>
25. Santurio D F, Costa MM, Maboni G, Cavalheiro CP, Dal Pozzo M, Alves SH, Fries LL. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. *Ciência Rural*. 2011; 41: 1051-1056. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000067>
26. Dame-Korevaar A, Fischer EAJ, Van Der Goot J, Stegeman A, Mevius D. Transmission routes of ESBL/pAmpC producing bacteria in the broiler production pyramid, a literature review. *Preventive Veterinary Medicine*. 2019; 162: 136-150. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.002>
27. Blaak H, Van Hoek AH, Hamidjaja RA, Van Der Plaats RQ, Kerkhof-de Heer L, Roda Husman AM, Schets FM. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0135402. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135402>
28. Daehre K, Projahn M, Semmier T, Roesler U, Friese A. Extended-spectrum beta-lactamase-/AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in broiler farms: transmission dynamics at farm level. *Microbial Drug Resistance*. 2018; 24 (4): 511-518. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2017.0150>
29. Sola-Gines M, Gonzalez-Lopez JJ, Camron-Veas K, Piedra-Carrasco N, Cerda-Cuellar M, Migura-Garcia L. Houseflies (*Musca domestica*) as vectors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Spanish broiler farms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015; 81 (11): 3604-3611. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04252-14>
30. Ilyas S, Rasool MH, Arshed MJ, Qamar UM, Aslam B. Prevalence of Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from chicken, water, and the poultry farm workers. *Pakistan Journal of Zoology*. 2021; 53 (5): 1847-1856. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20200228050200>
31. Dierikx CM, Van Der Goot JA, Smith HE, Kant A, Mevius DJ. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLOS ONE*. 2013; 8 (11): e79005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079005>
32. Koga VL, Rodrigues GR, Scandorieiro S, Vespero EC, Oba A, Brito BG, Brito KCT, Nakazato G, Kobayashi RKT. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2015; 12 (6): 479-85. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2014.1888>
33. Colacite J, Batista AP, Reis SLM, Assumpção J. Evaluation of the antimicrobial activity of different extracts of Ora-pro-nóbis leaves. *Brazilian Journal of Development*. 2022; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n5-040>
34. Maciel VBV, Bezerra RQ, Chagas EGL, Yoshida CMP, Carvalho RA. Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential alternative for iron supplementation and phytochemical compounds. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2021; 24: 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.18020>
35. Macedo MCC, Silva VDM, Serafim MSM, Veiga Correia VT, Pereira DTV, Amante PR, Silva ASJ, Mendonça HOP, Augusti R, Paula ACCFF, Fante CA. Elaboration and characterization of *Pereskia aculeata* Miller extracts obtained from multiple ultrasound-assisted extraction conditions. *Metabolites*. 2023; 13 (6): 691. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo13060691>
36. Wong F, Yong A, Ong H, Chaia T. Evaluation of the antibacterial activities of selected medicinal plants and determination of their phenolic constituents. *ScienceAsia*. 2013; 39: 591-595. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.591>
37. Pandini JA, Pinto FGS, Scur MC, Alves LFA, Martins CC. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2015; 9 (3): 48-55, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2014.5551>
38. Cunha MPV, Menão MC, Ferreira AJP, Knöbl TA. Similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humanas e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. 2013; 11 (1): 24-33. <https://doi.org/10.36440/recmvz.v11i2.16220>
39. Moulin-Schouleur M, Répérante M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45 (10): 3366-3376. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00037-07>