José Max Barbosa de Oliveira Junior (Organizador)



José Max Barbosa de Oliveira Junior (Organizador)

# Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza

Atena Editora 2019

# 2019 by Atena Editora

#### Copyright © Atena Editora

## Copyright do Texto © 2019 Os Autores

Copyright da Edição © 2019 Atena Editora

Editora Executiva: Profa Dra Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Natália Sandrini Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

#### Conselho Editorial

#### Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

- Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto Universidade Federal de Pelotas
- Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho Universidade de Brasília
- Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior Universidade Estadual de Ponta Grossa
- Profa Dra Cristina Gaio Universidade de Lisboa
- Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira Universidade Federal de Rondônia
- Prof. Dr. Gilmei Fleck Universidade Estadual do Oeste do Paraná
- Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
- Profa Dra Juliane Sant'Ana Bento Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior Universidade Federal Fluminense
- Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves Universidade Federal do Tocantins
- Profa Dra Natiéli Piovesan Instituto Federal do Rio Grande do Norte
- Profa Dra Paola Andressa Scortegagna Universidade Estadual de Ponta Grossa
- Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior Universidade Federal do Oeste do Pará
- Profa Dra Vanessa Bordin Viera Universidade Federal de Campina Grande
- Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme Universidade Federal do Tocantins

#### Ciências Agrárias e Multidisciplinar

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
- Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira Instituto Federal Goiano
- Profa Dra Daiane Garabeli Trojan Universidade Norte do Paraná
- Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva Universidade Estadual Paulista
- Prof. Dr. Fábio Steiner Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
- Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
- Prof. Dr. Jorge González Aguilera Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
- Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza Universidade do Estado do Pará
- Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior Universidade Federal de Alfenas



#### Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco - Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto - Universidade Federal de Goiás

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior - Universidade Federal do Oeste do Pará

Profa Dra Natiéli Piovesan - Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Profa Dra Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos - Universidade Federal do Maranhão

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profa Dra Vanessa Bordin Viera - Universidade Federal de Campina Grande

#### Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Eloi Rufato Junior - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos - Instituto Federal do Pará

Profa Dra Natiéli Piovesan - Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Takeshy Tachizawa - Faculdade de Campo Limpo Paulista

#### Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira - Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico

Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende - Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Msc. Leonardo Tullio - Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel - Universidade Paulista

Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva - Universidade Federal do Maranhão

Prof.<sup>a</sup> Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal

Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda - Universidade Federal do Pará

# Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

A532 Análise crítica das ciências biológicas e da natureza [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 1)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-357-6

DOI 10.22533/at.ed.576192705

 Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série.

CDD 610.72

#### Elaborado por Maurício Amormino Júnior - CRB6/2422

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná - Brasil

<u>www.atenaeditora.com.br</u>

contato@atenaeditora.com.br



# **APRESENTAÇÃO**

A obra "Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza" consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a "Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza" demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

# SUMÁRIO

CAPÍTULO 11
AGRICULTURA URBANA: O CASO DA HORTA COMUNITÁRIA ORGÂNICA DO PARQUE PREVIDÊNCIA, NO MUNÍCIPIO DE SÃO PAULO, SP
Lucas Sales dos Santos Ana Paula Branco do Nascimento Maria Solange Francos Milena de Moura Régis
DOI 10.22533/at.ed.5761927051
CAPÍTULO 218
SALICILATOS NAS PLANTAS E UTILIZAÇÃO NA AGRICULTURA
Roberto Cecatto Júnior Anderson Daniel Suss Bruna Thaina Bartzen Guilherme Luiz Bazei Vandeir Francisco Guimarães Lucas Guilherme Bulegon
DOI 10.22533/at.ed.5761927052
CAPÍTULO 334
ANÁLISE COMPARATIVA DA QUALIDADE DO AMBIENTE AQUÁTICO NOS RIOS BANDEIRA, ARROIO CAMPO BONITO E SANTA MARIA (CAMPO BONITO - PR) POR MEIO DE PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO RÁPIDA EM 2017 E 2018  Chrystian Aparecido Grillo Haerter
Irene Carniatto
DOI 10.22533/at.ed.5761927053
CAPÍTULO 442
ANALISES FÍSICO-QUÍMICAS DE AUTODEPURAÇÃO DE UM RIO NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE
Beatriz Cristina Lopes
Aryanne Cecilia Vieira de Souza  Emerson Augusto Queiroz Mendes Marques
DOI 10.22533/at.ed.5761927054
CAPÍTULO 553
PRESENÇA DE ADENOVIRUS HUMANO NAS ÁGUAS DO RIO CATURETÊ, SARANDI, RIO GRANDE
DO SUL
Brenda Katelyn Viegas da Rosa Rute Gabriele Fischoeder Ritzel Tatiana Moraes da Silva Heck Fabiano Costa de Oliveira Rodrigo Staggemeier Sabrina Esteves de Matos Almeida
DOI 10.22533/at.ed.5761927055

CAPITULO 658
SEGURANÇA ALIMENTAR: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA QUALIDADE DA ÁGUA NAS CRECHES PUBLICAS DO MUNICÍPIO DE PATOS-PB
Vitor Martins Cantal Talita Ferreira de Morais Clara Luz Martins Vaz
Lusinilda Carla Pinto Martins
Rosália Severo de Medeiros  DOI 10.22533/at.ed.5761927056
CAPÍTULO 7
Agüero Nicolás Facundo
Benítez Adriana Carla Moschner Lara María
Nuñez Gisell Romina
Varela Franco Martín  DOI 10.22533/at.ed.5761927057
CAPÍTULO 880
ANÁLISE DA FREQUÊNCIA RELATIVA DE TOXINAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ESCHERICHIA COLI COLETADAS DE BEZERROS COM DIARREIA, DO RECÔNCAVO BAIANO
Gabrielle Casaes Santana
Bruna Mamona de Jesus Eddy José Francisco de Oliveira
Claudio Roberto Nobrega Amorim
DOI 10.22533/at.ed.5761927058
CAPÍTULO 991
"AVALIAÇÃO DE DOR PÓS TRATAMENTO COM BANDAGEM KINESIO TAPE EQUINE EM ARTROSCOPIAS EM EQUINOS"
Vittoria Guerra Altheman Ana Liz Garcia Alves
Luiz Henrique Lima de Mattos
DOI 10.22533/at.ed.5761927059
CAPÍTULO 10101
INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA DEPOSIÇÃO DE GORDURA SUBCUTÂNEA EM BOVINOS NELORE (BOS INDICUS) E ANGUS (BOS TAURUS)
Guilherme Andraus Bispo Adam Taiti Harth Utsunomiya
Ludmilla Balbo Zavarez  Júlio César Pascoaloti de Lima
José Fernando Garcia
DOI 10.22533/at.ed.57619270510
CAPÍTULO 11
INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA ENDÓGENA NA QUANTIDADE E NA QUALIDADE OOCITÁRIA DE VACAS DA RAÇA NELORE
Rafael Augusto Satrapa Erica Sousa Agostinho
Daniel Ribeiro Guimarães de Menezes  Dagoberto de Almeida Junior

DOI 10.22533/at.ed.57619270511

CAPÍTULO 12117
USO DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA (NANOSKIN®) EM FERIDAS EXPERIMENTAIS NA ESPÉCIE OVINA
Camila Sabino de Oliveira Flávia de Almeida Lucas Fernanda Bovino
Matheus de Oliveira Souza Castro
DOI 10.22533/at.ed.57619270512
CAPÍTULO 13129
INFLUÊNCIAS DE PISCICULTURA EM TANQUES-REDE SOBRE ASPECTOS POPULACIONAIS E ALIMENTARES DE PEIXES SILVESTRES NO RESERVATÓRIO DE CHAVANTES (RIO PARANAPANEMA), SÃO PAULO, BRASIL
Aymar Orlandi Neto Denis William Johansem de Campos José Daniel Soler Garves
Érica de Oliveira Penha Zica Reinaldo José da Silva
Heleno Brandão
Augusto Seawright Zanatta Edmir Daniel Carvalho (in memorian) Igor Paiva Ramos
DOI 10.22533/at.ed.57619270513
CAPÍTULO 14140
INTERESSE DO CONSUMIDOR URBANO POR PESCADO COM RÓTULO OU CERTIFICADO ECOLÓGICO EM SANTOS/SP - BRASIL
Sílvia Lima Oliveira dos Santos Fabio Giordano
DOI 10.22533/at.ed.57619270514
CAPÍTULO 15149
PRESENÇA DE <i>Vibrio</i> ssp. PATOGÊNICOS EM CULTIVOS DE CAMARÃO MARINHOS
Beatriz Cristina Lopes
Emerson Augusto Queiroz Mendes Marques
DOI 10.22533/at.ed.57619270515
CAPÍTULO 16160
ANÁLISE SENSORIAL DE HAMBÚRGUER DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> EM DIFERENTES PROPORÇÕES COM CARNE DE FRANGO
Luiz Firmino do Santos Junior Ariéli Daieny da Fonseca Roatriz Garcia Longs
Beatriz Garcia Lopes Lucas Menezes Felizardo
Gláucia Amorim Faria Heloiza Ferreira Alves do Prado
DOI 10.22533/at.ed.57619270516

CAPÍTULO 17169
ANÁLISE DO CONTEÚDO DE GENÉTICA SOLICITADO NO EXAME NACIONAL DO ENSINO MÉDIO (ENEM) DE 2009 A 2017
Bárbara De Magalhães Souza Gomes Anna De Paula Freitas Borges
Camila De Assunção Martins Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva
DOI 10.22533/at.ed.57619270517
CAPÍTULO 18175
APRECIAÇÃO DO ENSINO DE GENÉTICA NO CURSO DE MEDICINA DE UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA DA PARAÍBA
Alessandra Bernadete Trovó de Marqui Natália Lima Moraes
Vanessa de Aquino Gomes Nathália Silva Gomes
Cristina Wide Pissetti  DOI 10.22533/at.ed.57619270518
CAPÍTULO 19187
ANATOMIA 3D IMPRESSA: ABORDAGEM EDUCACIONAL DA TECNOLOGIA MÉDICA
Guilherme Socoowski Hernandes Götz das Neves Gutemberg Conrado Santos Ana Cristina Beitia Kraemer Moraes
DOI 10.22533/at.ed.57619270519
CAPÍTULO 20
BACTÉRIAS VEICULADAS POR FORMIGAS CAPTURADAS EM AMBIENTES ALIMENTARES DE CRECHES DO MUNICÍPIO DE RONDONÓPOLIS-MT
Camila Elena Dilly Camargo
Raiane Teixeira Xavier  Meg Caroline do Couto
Daves Lopes Ocereu
Milene Moreno Ferro Hein Helen Cristina Favero Lisboa
DOI 10.22533/at.ed.57619270520
CAPÍTULO 21207
MODELO DE SIMULAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DA ESTRUTURA DA PAISAGEM NO ENTORNO DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE FECHOS – MG
Luciana Eler França Lourdes Manresa Camargos Luiza Cintra Fernandes
Fernando Figueiredo Goulart  DOI 10.22533/at.ed.57619270521

CAPÍTULO 22219
MÚSICAS INFANTIS POPULARMENTE DIFUNDIDAS E SUA INFLUÊNCIA NA PERCEPÇÃO SOBRE ARTHROPODA
Eltamara Souza da Conceição Daianne Letícia Moreira Sampaio Aldacy Maria Santana de Souza Josué de Souza Santana Luana da Silva Santana Sousa Samanta Jessen Correia Santana Tais de Souza Silva Zilvânia Martins de Oliveira
DOI 10.22533/at.ed.57619270522
CAPÍTULO 23
PARASITOLOGICAL DETECTION OF $Cryptosporidium$ spp. IN FECAL SAMPLES OF CARRIER PIGEONS ( $Columba\ livia$ ) IN TWO BREEDINGS
Amália Genete dos Santos Bruno César Miranda Oliveira Deuvânia Carvalho da Silva Elis Domingos Ferrari Sandra Valéria Inácio Walter Bertequini Nagata Katia Denise Saraiva Bresciani  DOI 10.22533/at.ed.57619270523
CAPÍTULO 24234
PERFIL DOS CASOS DE COQUELUCHE NO ESTADO DE GOIÁS
Marielly Sousa Borges Jefferson do Carmo Dietz Dayane de Lima Oliveira Roberta Rosa de Souza Murilo Barros Silveira
DOI 10.22533/at.ed.57619270524
CAPÍTULO 25241
POSSIBILIDADES NA FORMAÇÃO DOCENTE COM A GINÁSTICA PARA TODOS: VIVÊNCIAS EXPRESSIVAS INCLUSIVAS APLICADAS NA EDUCAÇÃO FÍSICA ESCOLAR
Marcos Gabriel Schuindt Acácio Rubens Venditti Júnior Ezequiel do Prado Silva Gilson Viana de Sobral Bianca Marcela Vitorino Barboza Rodolfo Lemes de Moraes Romulo Dantas Alves
DOI 10.22533/at.ed.57619270525
CAPÍTULO 26
POTENCIAL ECONÔMICO DA MICROBIOTA AMAZÔNICA
Luiz Antonio de Oliveira Cassiane Minelli-Oliveira
DOI 10.22533/at.ed.57619270526

CAPÍTULO 27
USO DE MAPA CONCEITUAL PARA APRENDIZAGEM DE CONCEITOS DE QUÍMICA NA EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
Angela Antunes
Aline Matuella M. Ficanha
Ana Sara Castaman Rúbia Mores
Luciana Dornelles Venquiaruto
Rogério Marcos Dallago
DOI 10.22533/at.ed.57619270527
CAPÍTULO 28
PROPAGAÇÃO DE DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> : UMA PROBLEMÁTICA DE SAÚDE PÚBLICA NO MUNICIPIO DE MARABÁ, PARÁ
Brenda Almeida Lima
Chayenna Araújo Torquato Athos Ricardo Souza Lopes
Sidnei Cerqueira dos Santos
DOI 10.22533/at.ed.57619270528
CAPÍTULO 29287
Alternanthera philoxeroides NO ESTUDO ETNOBOTÂNICO E ETNOFARMACOLÓGICO DE PLANTAS
UTILIZADAS POR COMUNIDADES QUILOMBOLAS DA REGIÃO DOS LAGOS/RJ
Luiza Gama Carvalho
Vinicius Fernandes Moreira
Marcos Vinicius Leal-Costa
DOI 10.22533/at.ed.57619270529
CAPÍTULO 30
ANATOMIA FLORAL DO CACTO EPÍFITO RHIPSALIS TERES (VELL.) STEUD. (CACTACEAE)
Beatriz Mendes Santos Odair José Garcia de Almeida
DOI 10.22533/at.ed.57619270530
CAPÍTULO 31
COLEÇÃO CENTENÁRIA DE EUCALIPTOS NA FLORESTA ESTADUAL "EDMUNDO NAVARRO DE ANDRADE"
Gabriel Ribeiro Castellano Rafael Jose Camarinho
DOI 10.22533/at.ed.57619270531
CAPÍTULO 32
JASMONATOS NAS PLANTAS E UTILIZAÇÃO NA AGRICULTURA
Roberto Cecatto Júnior
Anderson Daniel Suss
Bruna Thaina Bartzen
Guilherme Luiz Bazei Vandeir Francisco Guimarães
Lucas Guilherme Bulegon
DOI 10.22533/at.ed.57619270532

# **CAPÍTULO 8**

# ANÁLISE DA FREQUÊNCIA RELATIVA DE TOXINAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ESCHERICHIA COLI COLETADAS DE BEZERROS COM DIARREIA, DO RECÔNCAVO BAIANO

#### **Gabrielle Casaes Santana**

Universidade Estadual de Feira de Santana Feira de Santana – Bahia

#### **Bruna Mamona de Jesus**

Universidade Estadual de Feira de Santana Feira de Santana – Bahia

## **Eddy José Francisco de Oliveira**

Universidade Estadual de Feira de Santana Feira de Santana – Bahia

### Claudio Roberto Nobrega Amorim

Universidade Estadual de Feira de Santana Feira de Santana – Bahia

RESUMO: Colibacilose é a principal causa de morte entre bezerros recém-nascidos e no pósdesmame. E. coli Enterotoxigênica (ETEC), tem como característica a produção de duas enterotoxinas: a termolábil (LT) e a termoestável (ST). Foram isoladas 25 amostras de ETEC em fezes diarreicas. Para a identificação foram realizados dez testes bioquímicos. Os testes em ágar sangue não demonstraram a presença de amostras hemolíticas. A análise da eletroforese após a PCR indicou que todas as amostras apresentaram resultado positivo para a produção de LT-II. As bandas que se formaram na eletroforese indicam a presença do gene para produção da toxina LT-IIc, recentemente encontrado em bovinos. Estes resultados

sugerem que é necessário um estudo mais aprofundado e com uma amostragem maior para a identificação da prevalência das toxinas associadas à colibacilose bovina na região

**PALAVRAS-CHAVE:** colibacilose, toxina, *E. coli* 

ABSTRACT: Colibacillosis is the leading cause of death among newborn and postweaning calves. Enterotoxigenic E. coli (ETEC), is characterized by the production of two enterotoxins: thermolabile (LT) and thermostable (ST). Twenty-five samples of ETEC were isolated from diarrheal stools. For the identification, ten biochemical tests were performed. Tests on blood agar did not demonstrate the presence of haemolytic samples. Analysis of electrophoresis after PCR indicated that all samples showed a positive result for LT-II production. The bands that formed in the electrophoresis indicate the presence of the gene for the production of LT-IIc toxin, recently found in cattle. These results suggest that a more in-depth and larger sampling is needed to identify the prevalence of toxins associated with bovine colibacilosis in the region

**KEYWORDS:** colibacillosis, toxin, E. coli

# 1 I INTRODUÇÃO

Pertencente à família Enterobacteriaceae, a *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbica facultativa e gram negativa. Essa espécie possui características bioquímicas importantes para sua individualização quando contrastado com outros microorganismos são, entre outras: a capacidade de fermentar a lactose, produzir indol e reduzir nitratos (AZOLA, 2016). A *E. coli* pode causar patogenias a bovinos, suínos e ovinos, bem como a humanos. Limitada ao lúmen intestinal, a *E. coli* pode permanecer sem causar problemas ao indivíduo. Entretanto em casos de imunossupressão ou indivíduos debilitados, até mesmo cepas não patogênicas podem causar danos (STELLA, 2009).

Segundo NATARO & KAPER (1998), a *E. coli* pode ser classificada dentro de vários grupos, levando em consideração o conjunto gênico que caracteriza sua patogenicidade, são essas: ETEC (enterotoxigênica), EPEC (enteropatogênica) EAEC (enteroagregativa), DAEC (difusamente aderente), EHEC (enterohemorrágica), STEC (shigatoxigênica) e EIEC (enteroinvasiva). Para AZOLA (2016), a patogenicidade da *E. coli* se dá pela capacidade que a mesma possui de se instalar no organismo hospedeiro, colonizar-se e ali provocar alterações. Os fatores que contribuem para que isso aconteça são chamados de fatores de virulência. Segundo BRITO *et al* (2001), as toxinas de *E. coli* tais como: as enterotoxinas LT (termolábil) e ST (termoestável), o CNF (fator necrosante citotóxico) e a Toxina Shiga, são importantes fatores de virulência.

A E. coli Enterotoxigênica (ETEC), tem como característica principal a produção de duas enterotoxinas: a termolábil (LT) e a termoestável (ST). A LT, pode ainda dividirse em LT-I e LT-II. Ao estimular as prostaglandinas, há uma indução a secreção de líquidos, fazendo com que a célula afetada secrete AMPc em grande quantidade. Esse aumento na produção de AMPc, faz com que as microvilosidades intestinais diminuam a absorção de sódio e excrete cloro e bicarbonato. Assim, ocasiona o acúmulo de líquido no lúmen intestinal causando a diarréia (ALMEIDA, 2013; ANDRADE, 2013; SYDOW, 2005). A LT é uma proteína altamente imunogênica, com grande peso molecular e podem ser inativadas a 60°C em 15 minutos (AZOLA, 2016). A ST, também se subdivide em STa e STb. Ao ligar-se a seu receptor (guanilatociclase), induz a alta produção de GMPc. Esse aumento intracelular faz com que haja uma abertura dos canais de cloreto, assim, há a perda desse íon e água para a luz intestinal. Posteriormente, há uma diminuição na absorção de sódio e cloreto, feito pelas células das microvilosidades, mas ainda acontece a eliminação de íons cloreto para o lúmen. A toxina ST é uma proteína de baixo peso molecular e pouco imunogênica. Deixam de ser estáveis a 100°C durante 30 minutos. Vale ressaltar que ambas as enterotoxinas são encontradas em bovinos, porém não todos os subtipos, em bezerros encontrouse, até hoje, apenas STa e LT-1 (AZOLA, 2016).

Para outros grupos de *E. coli*, existem outras toxinas importantes como fatores de virulência, como o CNF (Fator Necrosante Citotóxico), o "eae" e a toxina Shiga. O CNF pode se subdividir em CNF 1 e CNF 2, segundo SYDOW (2005), o CNF 1 atua alterando

a organização da actina e tubulina do citoesqueleto da célula afetada, culminando na diminuição das microvilosidades das células do epitélio. Para CORREA (2012) e STELLA (2009), o fator eae é um gene que regula a intimida, uma proteína essencial no processo que leva a adesão da bactéria com a célula epitelial e produz uma lesão do tipo: "Attaching and effacing" que leva ao desaparecimento das microvilosidades do epitélio intestinal. A toxina Shiga, que se divide em: Stx1 e Stx2, são codificadas por bacteriófagos e é uma citotoxina muito potente, que provocam danos às células endoteliais, podendo causar diarréia com ou sem sangue. (CORRÊA, 2012; ALMEIDA, 2013).

Hoje tem-se muito bem disseminado na literatura que as características de virulência são codificadas por genes plasmidiais (MADIGAN, 2014). Os genes das toxinas LT-I e STa, por exemplo, são codificados por genes plasmidiais denominados *ent*, bem como o gene que codifica o CNF 2, que também é plasmidial.

A *E. coli* é uma das bactérias mais frequentemente encontrada nas amostras fecais de bezerros recém-nascidos com diarréia (AZOLA, 2016). A colibacilose é uma patogenia que acomete animais neonatos, causada pela ETEC. Ao se proliferar pelo intestino do animal, produz enterotoxinas que causam um aumento na secreção de líquido da circulação sistêmica para a luz intestinal, causando vários graus de diarréia e desidratação (RECK, 2009). Por causar uma enfermidade que acomete inúmeros prejuízos econômicos, o estudo das toxinas que causam a colibacilose se faz necessário, visto que ainda é escasso na literatura estudos epidemiológicos acerca de colibacilose no estado da Bahia. Tendo isso em vista, os objetivos desse trabalho foram: analisar a frequência relativa das toxinas de ETEC, provenientes de bezerros neonatos com diarreia do Recôncavo Baiano, identificar com base na frequência, quais tipos de toxinas são mais encontrados nas amostras de *E. coli* e verificar se há subgrupos ainda não encontrados em amostras bovinas.

# **2 I MATÉRIAIS E MÉTODOS**

#### 2.1 Amostras e identificação:

Foram utilizadas 25 amostras de fezes diarreicas de bezerros neonatos, cedidas pelo professor Joselito Nunes, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo Baiano. As amostras foram analisadas no laboratório de Microbiologia Aplicado à Saúde (LAMASP), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As amostras foram diluídas em meio tamponado pH 7,4 e semeadas em meio BHI a 35° por 24h. As culturas que apresentaram crescimento foram semeadas em Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 35° por 24h. As incubações foram feitas em estufa bacteriológica. As colônias que cresceram e apresentaram coloração verde metálica ou enegrecidas foram consideradas suspeitas

para *Escherichia coli* e seguiram para a identificação bioquímica.

## 2.2 Identificação bioquímica da Escherichia coli:

Foram realizados testes bioquímicos como: Fermentação de lactose no meio Agar MacConkey (incubação a 36°C por 24h); motilidade e descarboxilação de lisina utilizando meio MILI (incubação a 36°C por 24h); fermentação de carboidrato, produção de uréase e produção de sulfeto de hidrogênio utilizando meio EPM (incubação a 36°C por 24h); testes vermelho metila e Voges-Proskauer utilizando meio Clark-Lubs; teste do Indol e citrato de Simmon's (incubação a 36°C por 24h) A confirmação foi feita inoculando as amostras positivas para todos os testes mencionados em caldo EC, em banho maria por 24/48h a 45°C.

## 2.3 Extração do DNA bacteriano

O DNA foi extraído das amostras que apresentaram turbidez e liberação de gás no Caldo EC. Utilizou-se 0,2μL da amostra de *Escherichia coli* inoculada em caldo EC. O protocolo de extração utilizado foi o disponibilizado pelo Canadian Centre for DNA Barcoding, com modificações. Utilizou-se 300µL de Tampão de lise e 200µL de amostra e em seguida foram acondicionadas na estufa a 55°C por 3h. Em seguida foi adicionado 10µL de proteinase K e deixado mais 1h na estufa a 55°C. Posteriormente foi adicionado 100  $\mu$ L de Tampão BM (Tampão BB + Etanol) em cada amostra. As amostras foram agitadas no vórtex por 15 segundos e centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. A posteriori foram adicionados 180 µL de Tampão de Lavagem de Proteína (tampão PWB) balançando por 4x a amostra. Depois foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. Foram adicionados 600 µL de Tampão de Lavagem (Tampão WB) a cada amostra, que em seguida foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Ao fim do processo, os tubos foram vertidos vagarosamente em papel toalha para remoção do álcool e dos tampões. A amostras foram deixadas na estante numa placa de Petri, envolto por papel toalha, com a finalidade da evaporação completa do álcool. As amostras foram ressuspendidas utilizando 50  $\mu$ L de TE. Foi-se igualmente extraído DNA da linhagem padrão positiva PCLT-IIc e 5677STa para as toxinas LT-IIc e STa, que foram utilizadas como controle positivo.

#### 2.4 Reação da PCR

Os primers foram recebidos liofilizados e foi adicionado  $H_2O$  suficiente para deixalo em concentração de 100pMol. Após isso, os primers foram diluídos em soluções trabalho, onde utilizou-se  $450\mu$ L de  $H_2O$  e  $50\mu$ L de primer, onde a de concentração final ficou 10pMol. A quantificação do DNA extraído foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop. Em seguida as amostras foram submetidas a normalização para 100ng/ $\mu$ L (100pMol).

Utilizou-se para a reação de PCR (25uL),  $1\mu$ L de DNA a 100ng/ $\mu$ L (100pMol),

 $1\mu\text{L}$  de dNTP (10mM),  $0.8\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (50mM),  $1\mu\text{I}$  de Primer 1 (10pMol),  $1\mu\text{L}$  de Primer 2 (10pMol),  $0.5\mu\text{L}$  de EasyTaq® DNA polymerase (2,5U),  $2\mu\text{L}$  de Buffer 10x. A quantificação do DNA foi realizada com o auxílio espectrofotômetro NanoDrop. A amplificação dos genes de LT se deu em um termociclador onde o programa consistiu em: um estágio inicial de 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos (60°C para o gene da toxina STa), e extensão a 72°C por 30 segundos. Adicionado a isso, um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. A descrição dos primers, bem como o tamanho do produto esperado está descrito na Tabela 1.

Primer	Sequência	Tamanho do produto esperado	Referência
LT-II	5-AGATATAATGATGGATATGTATC-3 5-TAACCCTCGAAATAAATCTC-3	300	SALVADORI et al. (2003)
STa	5-TCCGTGAAACAACATGACGG-3 5-ATAACATCCAGCACAGGCAG-3	244	SALVADORI et al. (2003)

Tabela 1. Lista de primers utilizados na reação da PCR.

A análise foi feita em gel de agarose 2%, tampão TBE 1X em cuba eletroforética nas condições de 110V por 40 minutos. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foi determinado pelo marcador molecular de 100pb Ladder  $1\mu g/\mu L$ . O gel foi corado utilizando Coralload 10x e Gel Red e foram visualizados em transiluminador UV.

#### 2.5 Detecção da toxina hemolisina

Para detecção dessa toxina, utilizamos a metodologia empregada por RIBEIRO *et al.* (2006), com modificações. A bactéria foi cultivada em placas de Petri contendo meio ágar sangue, com concentração de 5% de sangue, a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas.

#### 2.6 Cálculo da frequência e intervalo de confiança para proporções.

O cálculo da frequência foi feito com o seguinte cálculo: FR= NP/NT \* 100. Onde: FR= frequência relativa; NP= número de amostras positivas; NT= número total de amostras. Sobre os dados obtidos foi aplicado um cálculo de Intervalo de Confiança para proporções.

#### **3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As amostras apresentaram crescimento verde metálico quando cultivadas em EMB, demonstrando que se tratavam de bactérias gram-negativas. O resultado dos

testes bioquímicos indicou que eram *Escherichia coli*, visto que as colônias semeadas em meio Agar MacConkey apresentaram colônias rosa-claro, características de *E. coli*, indicando que são fermentadoras de lactose. Além deste, os outros testes que deram positivo foram: Vermelho Metila (VM), produção de indol e descarboxilação de lisina. Os resultados negativos foram para os testes Voges-Proskauer, produção de sulfeto de hidrogênio, utilização de citrato e motilidade. Segundo FORTES (2010), a motilidade em *E.coli* é variável. O flagelo constitui o antígeno flagelar "H" e sua presença é variável a depender da cepa analisada e por essa razão não possuem relação direta com a patogenicidade. O que explica a ausência de motilidade nas amostras.

A análise da eletroforese indicou que todas as amostras apresentaram resultado positivo para a produção de LT-II (Figura 1). Nesse caso, a frequência relativa das amostras analisadas foi de 100%. Podendo inferir que ao nível de 95% de confiança, o intervalo de confiança para as amostras analisadas é de 100%.



**Figura 1**: Eletroforese em Gel de Agarose. **A**: Ladder 100pb; **B**: Amostra Padrão PCLT-Ilc (Controle positivo); **1-25**: Amostras, onde: **1**: 3776(4); **2**: 3776(5); **3**: 3399(1); **4**: 3399(3); **5**: 3399(4); **6**: 3399(5); **7**: 3350(1); **8**: 3350(2); **9**: 3350(4); **10**: 3350(5); **11**: 3718(1); **12**: 3718(3); **13**: 3718(4); **14**: 3718(5); **15**: 3376(1); **16**: 3376(2); **17**: 3376(3); **18**: 3376(4); **19**: 3376(5); **20**: 3247(2); **21**: 3247(3); **22**: 3247(4); **23**: 3247 (5); **24**: 3680(1); **25**: 3680(3); **C**: Controle negativo

Na literatura, é possível encontrar registros de LT em amostras patogênicas de *Escherichia coli*, oriundas de fezes diarreicas de bezerro (AZOLA, 2016; COURA *et al.*, 2014; STELA, 2009); UGRINOVICH *et al.* (2002). Entretanto, nem todos os subtipos de LT se fazem presentes. Até o momento, na literatura é possível encontrar trabalhos em que se identificaram apenas LT do tipo II, em amostras de fezes oriundas de bezerros com diarreia (AZOLA, 2016; JOBLING, 2016; UGRINOVICH *et al.*, 2002). A toxina LT-II ainda se subdivide em LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc, destas, foram identificadas em bezerros apenas LT-IIa e LT-IIb, sendo que LT-IIc foi descrito recentemente por NAWAR (2010) e encontrado apenas em amostras de avestruzes doentes (JOBLING, 2016; NAWAR, 2010).

Identificar o gene para a produção da toxina LT-II nas amostras fecais indica que

a diarreia foi causada por ETEC. Segundo SANTOS (2014), o mecanismo de ação da toxina LT como causadora de diarreia esta relacionado ao contato e ligação pela subunidade B da proteína à superfície da célula alvo. A toxina então adentra a célula e é transportada do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático. No retículo ocorre a dissociação da subunidade A1, do restante da molécula. Em seguida a proteína migra para o citoplasma, onde pode causar seus efeitos. A subunidade A1 ativa permanentemente a adenilato ciclase, ocasionando o aumento de AMP cíclico. Esse composto é responsável pela abertura de diversos canais localizados na membrana, dentre eles, o receptor transmembrana responsável pela perda de eletrólitos para o lúmen intestinal. Devido a diferença entre a concentração dos eletrólitos, a água migra para o lúmen, por osmose, levando a diarreia. A estrutura das toxinas LTs estão demonstradas na Figura 2. Ainda segundo SANTOS (2014), as toxinas LT-I e LT-II apesar de estarem relacionadas apresentam apenas 16% de identidade entre as suas subunidades B, enquanto que apresentam 52% de identidade entre seus aminoácidos.

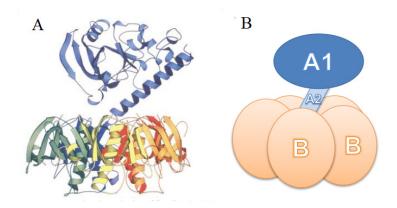


Figura 2: **A**: Estrutura cristalográfica das toxinas LTs de *Escherichia coli* enterotoxigênica; **B**: Representação esquemática de suas subunidades. Fonte: SANTOS, 2014.

A amostra padrão (PCLT-IIc) utilizada para a reação da PCR é positiva para o gene LT-IIc. As bandas que se formaram na eletroforese indicam que todas as amostras apresentam bandas similares a que se formou no poço da amostra padrão Nesse caso, há probabilidade das cepas. de *E. coli* analisadas apresentarem o gene para produção da toxina LT-IIc, recentemente encontrado em bovinos.

Segundo AZOLA (2016), UGRINOVICH *et al.* (2002) e NATARO & KAPER (1998), a toxina ST pode ser encontrada em fezes diarreicas de bovino, entretanto, não todos os subtipos. A ST, divide-se em STa e STb, desses, apenas STa é encontrado em fezes diarreicas de bezerros, ao passo que STb é normalmente encontrada em suínos. NATARO & KAPER (1998), mencionam em seu trabalho que é possível encontrar cepas de *E. coli* que podem expressar somente a toxina LT ou ST, mas podem também expressar ambas as toxinas.

Das 25 amostras obtidas, apenas 10 foram utilizadas para a identificação do

gene para produção da toxina STa. Entretanto, os resultados da ampliação na reação da PCR foram inconclusivos.

A presença de hemolisina foi negativa para todas as 25 amostras, não foi verificado halo hemolítico parcial nem total (Figura 3, 4 e 5). Dessa forma, um total de 100% de amostras negativas. Ao nível de 95% de confiança, o intervalo de confiança para as amostras analisadas é de 100%.

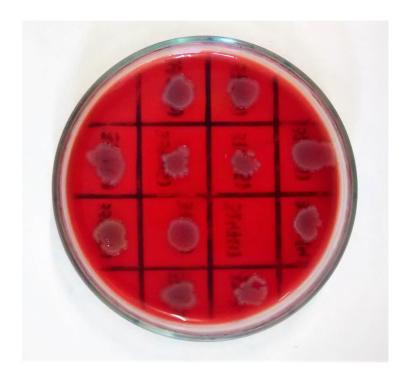


Figura 3: Resultado da semeadura em Agar-sangue. Não é encontrado halo hemolítico



Figura 4: Resultado da semeadura em Agar-sangue. Não é encontrado halo hemolítico

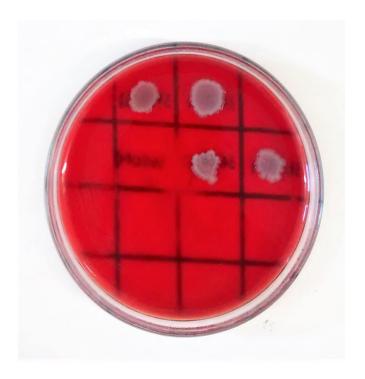


Figura 5: Resultado da semeadura em Agar-sangue. Não é encontrado halo hemolítico

Na literatura é possível encontrar trabalhos em que a produção de hemólise por cepas de E. coli é variável, dependendo da cepa analisada (COSTA et al., 2014; FORTES, 2008; SALVADORI et al., 2003). Segundo ALMEIDA (2013), a produção de hemolisina é importante, pois, a partir dela a bactéria consegue capturar ferro, através da lise de eritrócitos. Sendo a aquisição de ferro, um importante fator de virulência. Para QUINN et al. (2005), embora a produção de hemolisina seja um marcador útil da virulência em algumas cepas de E. coli, essa toxina pode não necessariamente estar relacionada com a sua virulência, mas sim com à expressão de outros fatores de virulência. Ainda segundo QUINN et al. (2005), a frequência de hemolisina é maior em amostras de Escherichia coli provenientes de fezes diarreicas de suíno, o que pode explicar a ausência dessa toxina em nossas amostras.

#### 4 I CONCLUSÕES

Conclui-se que das 100% amostras analisadas apresentaram o gene para a produção da toxina LT, podendo ser dos subtipos existentes o LT-IIc, recentemente encontrado em fezes diarreicas de bezerros, sendo, portanto, a toxina mais encontrada nas amostras. Também pode-se afirmar que 100% das amostras não são hemolíticas. Estes resultados sugerem que é necessário um estudo mais aprofundado e com uma amostragem maior para a identificação da prevalência das toxinas associadas à colibacilose bovina na região

#### **REFERÊNCIAS**

ALMEIDA, A.M. de S; 2013. **Caracteristicas biológicas e antigênicas de** *Escherichia coli* **com ênfase aos genes de virulência.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia

ANDRADE, F.B.; 2013. **Padronização e avaliação de PCR multiplex para o diagnóstico de Escherichia coli enteroagregativa** típica e atípica. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, Instituto Butantan. São Paulo.

AZOLA, J.S.M.; 2016. Genes de virulência e perfil de susceptibilidade a extratos vegetais de isolados de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC), Shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em bezerros. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

COSTA, K.O. *et al.*; 2014. **Fatores de virulência das amostras de Escherichia coli isoladas de bezerros com diarréia na região de Feira de Santana, Bahia**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, 36(4):430-436

COURA, F.M *et al.*; 2014. **Patotipos de** *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. Pesq. Vet. Bras. 34(9):811-818.

FORTES, F. B. B.; 2008. **Perfil Bioquímico de amostras de** *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JOBLING, M.G.; 2016. The chromosomal nature of LT-II enterotoxins solved: a lambdoid prophage encodes both LT-II and one of two novel pertussis-toxin-like toxin family membersin type II enterotoxigenic Escherichia coli Pathogens and Disease. 2016, 74 (3).

NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; 1998. **Diarrheagenic** *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews; 11(1): 142-201

NAWAR *et al.*; 2010. **LT-IIc, a New Member of the Type II Heat-Labile Enterotoxin Family Encoded by an Escherichia coli Strain Obtained from a Nonmammalian Host**. Infection and Immunity,78 (11): 4705–4713.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. (Ed.). **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. Pp. 512.

RECK, M.V.M., 2009. **Diarréia Neonatal Bovina**. Porto Alegre, UFRGS. Disponível em: <a href="https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/22919/000735566.pdf?sequence=1">https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/22919/000735566.pdf?sequence=1</a>. Data de acesso: 14 Ago 2017.

RIBEIRO, M.G et al.; 2006. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isolados de mastite bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58(5): 724-731.

SALVADORI, M. R. et al. 2003. *Virulence factors of Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Brazil.* Brazilian Journal of Microbiology 34: 230-235.

SANTOS, C. M. 2014. **Toxinas termo-labéis (LTs) do tipo II de** *Escherichia coli* **enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória.** Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de ciências biomédicas. Universidade de São Paulo.

STELLA, A.E.; 2009. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

São Paulo.

UGRINOVICH *et al.*; 2002. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. Ciência Rural, Santa Maria, 32(2): 289-291.

#### **SOBRE O ORGANIZADOR**

JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR é graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). Mestre em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Doutor em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). É professor Adjunto I da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), lotado no Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA). Orientador nos programas de Pós-Graduação stricto sensu em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida (PPGSAQ-UFOPA); Sociedade, Natureza e Desenvolvimento (PPGSND-UFOPA); Biodiversidade (PPGBEES-UFOPA) e Ecologia (PPGECO-UFPA/EMBRAPA). Membro de corpo editorial dos periódicos Enciclopédia Biosfera e Vivências. Tem vasta experiência em ecologia e conservação de ecossistemas aquáticos continentais, integridade ambiental. ecologia geral, avaliação de impactos ambientais (ênfase em insetos aquáticos). Áreas de interesse: ecologia, conservação ambiental, agricultura, pecuária, desmatamento, avaliação de impacto ambiental, insetos aquáticos, bioindicadores, ecossistemas aquáticos continentais, padrões de distribuição.

Agência Brasileira do ISBN ISBN 978-85-7247-357-6

9 788572 473576