

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Escherichia coli* DE ORIGEM ANIMAL

Winícius Bueno de Souza¹, Nayra Rodrigues de Alcântara², Maria Auxiliadora Andrade³, Taís Ferreira de Almeida⁴, Eliete Souza Santana⁵

¹Acadêmico do curso de Agronomia, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Palmeiras de Goiás, Bolsista PIBIC-CNPq

²Bióloga e Técnica do Laboratório de Microbiologia, Câmpus Palmeiras de Goiás

³Docente da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

^{4,5}Docente do curso de Agronomia, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Palmeiras de Goiás (elietessouza@yahoo.com.br)

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

Foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar o potencial das seguintes espécies de plantas tidas como medicinais: erva cidreira, vinca, losna, babosa, capim cidreira, erva de santa maria, hortelã, baru, pimenta bode e tanchagem. Os extratos vegetais foram obtidos através de maceração das plantas, diluição em uma solução hidroalcoólica, incubação por sete dias e filtração. Para os testes *in vitro* foi realizada a técnica de semeadura das amostras de *E. coli* sobre a superfície do Ágar Muller-Hinton, e foram colocados discos de antibióticos comerciais como controle e discos de papéis filtro embebidos nos extratos vegetais. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, e os resultados consistiram na leitura do diâmetro dos halos de inibição dos extratos vegetais e dos antibióticos, as médias dos diâmetros foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Observou-se que, cepas de *E. coli* provenientes de leite bovino apresentaram baixa sensibilidade aos extratos vegetais avaliados, enquanto as amostras de *E. coli* de origem aviária apresentaram 100% de sensibilidade aos extratos vegetais, porém com halo de inibição inferior ao antimicrobiano comercial. Conclui-se que, a baixa ou nenhuma eficiência dos extratos vegetais ao desenvolvimento da *E. coli*, pode estar relacionada à forma de preparação dos extratos ou ao método de avaliação utilizado, pois a literatura registra vários estudos *in vitro* de diversos extratos vegetais sobre microrganismos, entretanto, observa-se que os mesmos podem ser avaliados por diversos métodos para medição do efeito inibitório, não existindo um processo padrão como existe para antibióticos, o qual pode ser estabelecido em pesquisas futuras.

PALAVRAS-CHAVE: aves, bactéria, bovinos, plantas medicinais

EVALUATION OF THE POTENTIAL OF PLANT EXTRACTS IN CONTROL *IN VITRO* OF *Escherichia coli* ANIMAL

ABSTRACT

A study was conducted to evaluate the potential of the following species of medicinal plants taken as: lemon grass, vinca, wormwood, aloe, lemon grass, herb santa maria, mint, baru, goat pepper and tanking. The plant extracts were obtained by maceration of the plants, diluted in a water-alcohol solution, incubating for seven

days and filtered. For testing in vitro seeding technique of *Escherichia coli* on the surface of Muller-Hinton agar was conducted, and commercial antibiotic discs as control and filter paper discs soaked in plant extracts were stored. The plates were incubated at 37 °C for 24h, and the results consisted in reading the diameters of inhibition of plant extracts and antibiotics, the average diameters were compared by Tukey test at 5% significance. It was observed that strains of *E. coli* from bovine milk showed low sensitivity to the evaluated plant extracts, while samples of *E. coli* of avian origin showed 100% sensitivity to herbal extracts, but with inhibition zones below the commercial antimicrobial. It is concluded that at low or no development efficiency of plant extracts of *E. coli*, may be related to how to prepare the extracts or the method of evaluation, because the literature shows several in vitro studies of various plant extracts on microorganisms however, it is observed that they can be evaluated by several methods for measuring the inhibitory effect, and there is a standard process as there is for antibiotics, which can be established in future research.

KEYWORDS: birds, bacteria, cattle, medicinal plants

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa em forma de bastão, pertencente a família *Enterobacteriaceae*, não esporuladas e são facultativamente anaeróbias (FERREIRA & KNÖBL, 2009). São bactérias fermentadoras de açúcares e crescem rapidamente em meios simples de cultura (GYLES et al., 2004; WIKIPÉDIA, 2014).

Essas bactérias estão presentes no trato gastrointestinal de mamíferos e aves, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal (MÂCEDO et al., 2012). No entanto, esse microrganismo apresenta várias cepas patogênicas que podem causar infecções sistêmicas, denominadas de colisepticemia, ou infecções extraintestinais no homem e nos animais, por possuir fatores específicos de patogenicidade (MOURA & FERNANDES, 2010).

Cepas de *E. coli* patogênica para as aves (APEC) causam doenças extra-intestinais como aerossaculite, pericardite, perihepatite, celulite, salpingite, onfalite, peritonite e morte (MELLATA et al., 2003; MACHADO, 2010). Nas aves, essas patologias são denominadas de colibacilose avícola e causam prejuízos econômicos ao setor avícola no mundo todo (ANTÃO et al., 2008). Em humanos, *E. coli* patogênica pode causar infecções intestinais, urinárias, septicemias e meningites (MOURA & FERNANDES, 2010).

Avaliando o setor de produção animal, os prejuízos causados não se restringem apenas a morte de animais, mas aos custos com medicamentos, diminuição dos índices zootécnicos, mas principalmente devido a condenações de carcaças por aerossaculite e celulite em abatedouros frigoríficos. Entre os critérios de condenação utilizado por BRASIL (1998) e descritos por MACHADO (2010), processos inflamatórios implicados com *E. coli* (artrites, aerossaculite, celulites, dermatites e salpingites) são listados como causa de condenação parcial ou total.

A limitação ao uso de drogas antimicrobianas na produção animal nos últimos anos, fez com que técnicos e pesquisadores estudem alternativas ao uso de antibióticos, que mantenha a eficiência produtiva e a eficácia nos tratamentos profiláticos e terapêuticos. Para atender essa demanda cresceu o interesse em estudos quanto à utilização de compostos naturais como promotores de crescimento e medicamentos.

Diante disso, foi desenvolvido um trabalho com o objetivo de avaliar o potencial de 10 espécies tidas popularmente como medicinais na inibição do desenvolvimento de *Escherichia coli* obtidas de amostras aviárias (frangos de corte) e de leite bovino proveniente de animais com sintomatologia de mastite. Foram avaliadas as eficiências das seguintes espécies: erva cidreira, vinca, losna, babosa, capim cidreira, erva de Santa Maria, hortelã, baru, pimenta bode e tanchagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos extratos vegetais

Após a obtenção das plantas, as mesmas foram levadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Palmeiras de Goiás. As partes foliares foram separadas e higienizadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. Foram utilizadas 30g de folha de cada planta medicinal (Quadro 1).

QUADRO 1. Plantas utilizadas no preparo de extratos vegetais hidroalcoólicos visando o controle *in vitro* de *Escherichia coli*

Nome vulgar	Nome científico	Família	Parte Utilizada
Erva cidreira	<i>Melissa officinalis</i>	Labiatae	Folha
Baru	<i>Dipteryx alata</i>	Fabaceae	Folha
Babosa	<i>Aloe vera</i>	Liliaceae	Folha
Capim cidreira	<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Folha
Hortelã	<i>Mentha spicata</i>	Lamiaceae	Folha
Erva de Santa Maria	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Chenopodiaceae	Folha/Semente
Losna	<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae	Folha
Vinca	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Folha
Tanchagem	<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	Folha
Pimenta bode	<i>Capsicum chinense</i>	Solanaceae	Fruto/Semente

Adaptado de LORENZI & MATOS (2002).

Após a higienização, as folhas foram submetidas ao processo de maceração manual. O macerado foi transferido para uma solução padrão hidroalcoólica, composta de 125 mL de água e 25 mL de álcool etílico hidratado 92, 8°. Depois de preparadas, as soluções permaneceram em repouso por sete dias, em temperatura ambiente e ausência de luz. Após a realização de testes preliminares, ficou definido como a melhor metodologia para extração, o período de sete dias de incubação.

Para a filtragem dos extratos vegetais foi utilizado papel filtro que teve como objetivo reter o máximo possível as impurezas, sendo este processo realizado inúmeras vezes até que o produto atingisse uma tonalidade mais clara e pura, este procedimento foi de grande importância pois facilitou a etapa de esterilização dos extratos.

A esterilização dos extratos medicinais foi realizada através de membrana Millipore®, processo este que foi realizado em câmara de fluxo a fim de evitar

contaminação. Após a filtração, os extratos foram armazenados em frascos escuros e em temperatura ambiente.

Realização dos ensaios *in vitro*

Para a realização dos ensaios *in vitro* com *E. coli*, as cepas utilizadas foram de origem aviária e de leite bovino de animais que apresentavam sintomatologia de mastite, as quais foram doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Utilizou-se o teste de sensibilidade por difusão em disco, metodologia de BAUER-KIRBY (2011). O inóculo foi preparado pelo método de suspensão direta com 3 a 4 colônias de bactérias, as quais foram suspensas em caldo Brain-Heart-Infusion (BHI) com incubação por uma hora a 37°C. A inoculação foi feita com suabe umedecido no inóculo, em seguida semeado sobre a superfície do Ágar Muller-Hinton (MH), foram utilizados dois discos com antimicrobianos como controle, ampicilina (10 mcg) para as *E. coli* de origem de leite bovino e ciprofloxacina (5 mcg) para as *E. coli* de origem aviária, ambos os antibióticos são indicados na literatura para o tratamento de *E. coli*.

Foram utilizados discos de papel filtro com diâmetros semelhantes aos dos antimicrobianos, um deles continha apenas a solução padrão hidroalcoólica da mesma concentração em que foram preparados os extratos vegetais, e os demais discos continham os extratos das seguintes espécies de plantas: erva-cidreira, losna, pimenta, tanchagem, baru, capim-cidreira, erva-de-santa-maria, vinca, babosa e hortelã. Os discos de papel filtro, antes de serem utilizados nos testes *in vitro*, ficaram imersos durante 24 horas nos extratos vegetais.

Os discos foram colocados cerca de 3 cm de distância um do outro, sobre o ágar já inoculado (KONEMAN et al., 2001). Após a incubação foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição de acordo com CLSI/NCCLS (2005). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, posteriormente, realizou-se a leitura dos testes, detectando-se a resistência ou sensibilidade aos tratamentos, de acordo com o tamanho dos halos formados ao redor do disco.

Delineamento estatístico

O experimento foi realizado em blocos casualizados (DBC), constituído 11 tratamentos (extratos vegetais + antibiótico) e cinco repetições, visto que cada repetição corresponde à uma placa de Petri.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o software estatístico ESTAT. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que, cepas de *E. coli* provenientes de leite bovino mostraram maior índice de sensibilidade frente ao antibiótico de uso comercial ampicilina, em relação aos extratos vegetais avaliados, entretanto, não foi observada diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 1).

TABELA 1. Perfil de resistência da *E. coli* de origem de leite bovino à solução padrão hidroalcoólica, aos extratos vegetais avaliados e ao antibiótico utilizado como testemunha

Tratamentos	Halos (mm)	Tratamentos	Halos (mm)
Solução Padrão	-	Ampicilina ¹	15a
Erva Cidreira	-	Santa Maria	5b
Vinca	-	Hortelã	4b
Losna	-	Baru	4b
Babosa	-	Pimenta Bode	2b
Capim Cidreira	5b	Tanchagem	-
Teste F	0,41 ^{ns}		
DMS	0,64		

(-) - ausência de halos; ¹Ampicilina 10 mcg - <11 (res)/ 12-13 (int)/ >14 (sens)

^{ns} Não Significativo pelo Teste F ($P \leq 0,01$) - Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Apesar do antibiótico utilizado apresentar eficácia sobre o microrganismo avaliado, tem-se a necessidade de se introduzir produtos alternativos na produção animal, pois os mesmos possuem restrição de uso pelos mercadores exportadores, tanto para o tratamento de infecções, tanto no uso de aditivos melhoradores de desempenho zootécnico, por aumentarem a conversão alimentar e o ganho de peso do animal, devido ao aparecimento de resistência bacteriana, pois deixam resíduos nos produtos finais, como carne, leite e ovos (CASTANON, 2007).

Os compostos de origem natural são apontados como alternativas para serem usados na prática médica humana e veterinária por apresentarem baixo índice residual. Entretanto, nos testes realizados, observou-se sensibilidade considerável da *E. coli* de origem de leite mastítico apenas aos extratos de capim-cidreira, de erva de Santa Maria e de hortelã. A *E. coli* apresentou baixa ou nenhuma sensibilidade aos demais extratos vegetais estudados. Esses resultados podem estar relacionados à resistência bacteriana provocada pelo uso indiscriminado de antibióticos comerciais pelos produtores, que na maioria das vezes, realizam tratamentos das infecções mamárias sem análises prévias, como cultura bacteriana e antibiograma. Estes fatores produzem como consequência, a redução da produção e da qualidade do leite, ocasionando queda no rendimento industrial e descarte precoce ou morte dos animais (LANGONI et al., 2011).

Outro fator de relevância é que *E. coli* é um microrganismo de difícil controle no rebanho, pois é considerado um dos principais agentes da mastite bovina de origem ambiental (RIBEIRO et al., 2006), ou seja, possui como reservatório o ambiente em que a vaca vive, principalmente onde há acúmulo de esterco, urina, barro e camas orgânicas (CAMARGO, 2013). Pesquisas realizadas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, influentes na produção leiteira, estimaram as perdas pela

doença em aproximadamente US\$ 317,93/vaca/ano e os prejuízos em US\$20.611,32/propriedade/ano (MARTINS et al., 2010, CAMARGO, 2013). O investimento em programas de controle e profilaxia da mastite, bem como de introdução de novos medicamentos, são de fundamental importância (MARTINS et al., 2010), e novas terapias são necessárias.

Já as amostras de *E. coli* de origem aviária apresentaram 100% de sensibilidade aos extratos vegetais analisados, sendo que o antimicrobiano comercial, Ciprofloxacina, mesmo apresentando um halo superior aos dos extratos vegetais, indica resistência ao microrganismo avaliado (Tabela 3). Porém, não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições inferiores.

TABELA 2. Perfil de resistência da *E. coli* de origem aviária à solução padrão hidroalcoólica, aos extratos vegetais avaliados e ao antibiótico utilizado como testemunha

Tratamentos	Halos (mm)	Tratamentos	Halos (mm)
Solução Padrão	-	Ciprofloxacina ¹	10a
Erva Cidreira	7ab	Santa Maria	6ab
Vinca	4b	Hortelã	6ab
Losna	6ab	Baru	7ab
Babosa	3b	Pimenta Bode	6ab
Capim Cidreira	7ab	Tanchagem	7ab
Teste F	11,64**		
DMS	0,57		

(-) ausência de halo; 1Ciprofloxacina 5 mcg - <15 (res)/ 16-20 (int)/ >21 (sens)

** Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F ($P \geq 0,05$) - Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os diâmetros dos halos observados foram semelhantes para todos os extratos vegetais avaliados, os quais não diferiram estatisticamente entre si, demonstrando baixa eficiência sobre a *E. coli* de origem aviária. Uma explicação plausível seria a *E. coli* compor o grupo das bactérias Gram-negativas, pois organismos desse grupo possuem uma membrana externa que envolve a parede celular, o que limita a difusão dos compostos hidrofóbicos através da sua camada de lipopolissacarídeos (BURT, 2004). Apesar de que, estudo desenvolvido por LORENZI et al. (2009) terem demonstrado o potencial inibidor de vários extratos vegetais contra várias espécies de bactérias Gram-negativas, inclusive *E. coli*.

Pesquisas com extratos vegetais revelam que os mesmos, quando são adicionados nas rações de frangos, podem ser eficientes em melhorar a utilização dos nutrientes. Avaliando o desempenho de frangos de corte criados em galpões com baixo desafio sanitário, TOLEDO et al. (2007) observaram maior ganho de peso e maior taxa de viabilidade nos tratamentos que receberam uma mistura de plantas medicinais, demonstrando a eficiência de sua utilização *in vivo* e sua potencial substituição a antibióticos promotores de crescimento, os quais tem seu uso proibido na indústria avícola, a qual busca por substâncias alternativas, que atendam as determinações oficiais e mantenham ou melhorem o padrão zootécnico alcançado atualmente.

Estudos demonstram ainda, que extratos vegetais também podem aliviar o estresse imunitário dos animais (RIZZO et al., 2010). Ainda, de acordo com a literatura, o uso de plantas para curar doenças, incluindo doenças infecciosas, tem sido extensivamente aplicada pelas pessoas, e os seus resultados revelam um grande potencial das plantas para tratamentos terapêuticos, apesar do fato que elas não tenham sido completamente estudadas, mais estudos precisam ser conduzidos para pesquisar sobre novos componentes. Sendo que, uma vez extraídos, e antes de serem usados como tratamento terapêutico, eles devem ter a toxicidade testada *in vivo*. Testes têm demonstrado a toxicidade de extratos de diferentes plantas (HOCAYEN et al., 2012).

No passado, a fitoterapia era mais adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente em países da Ásia, América Latina e África (DUARTE, 2006).

Como o Brasil se destaca como um dos maiores exportadores de produtos de origem animal, infecções causadas por microrganismos patogênicos como a *E. coli* podem acarretar prejuízos econômicos inestimáveis em diversos setores da produção animal como bovinocultura, avicultura e suinocultura, além de gerar grande preocupação à saúde pública.

CONCLUSÕES

Os extratos vegetais avaliados apresentaram baixa ou nenhuma eficiência ao desenvolvimento da *E. coli*, o que pode estar relacionado à forma de preparação dos extratos ou ao método de avaliação utilizado, pois a literatura possui vários estudos *in vitro* de diferentes extratos vegetais sobre diversas bactérias, porém, observa-se que os mesmos podem ser avaliados por diversos métodos para medição do efeito inibitório, não existindo um processo padrão como existe para antibióticos, o qual pode ser estabelecido em pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

ANTÃO, E. M.; GLODDE, S.; LI, G.; SHARIFI, R.; HOMEIER, T.; LATURNUS A, C.; DIEHL, I.; BETHE, A.; PHILIPP, H.; PREISINGER, C. R.; WIELER, L. H.; EWERS, C. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 361–369, 2008.

BAUER-KIRBY. 2011. **Trabalho elaborado pela equipe do Setor Técnico da Laborclin destinado à orientação para execução do antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer.** Disponível em: http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf. Acesso em: 10/06/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 193 de 12 de maio. Regulamento Técnico Para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 1998.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in Foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAMARGO, L. R. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas brasileiras sobre *Escherichia coli*.** Dissertação (Mestrado) apresentado ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2013. 60 p.

CASTANON, J.I. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**. v. 86, n. 11, p. 2466-71, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmed.org>>. Acesso em: 28 maio de 2014.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. National Comitee for Clinical Laboratory Standards. Interference Testing in Clinical Chemistry: Aprovod Guideline, EPO7-A2. Wayne, PA: CLSI/NCCLS; 2005.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinai s e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, 2006. 12 p.

FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. **Doença das aves**. 2 ed. Campinas: Fundação APINCO. p.457-471, 2009.

GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. [online]. 3 ed. Australia: Blackwell Publishing Asia. 2004. Disponível em: <http://openlibrary.org/books/OL9771790M/Pathogenesis_of_Bacterial_Infections_in_Animals>. Acesso em: 15 de out. de 2013.

HOCAYEN, P.A.S.; CAMPOS, L.A.; POCHAPSKI, M.T.; MALFATTI, C.R.M. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Revista de Botânica**, n. 41, p. 23-31, 2012.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA. et al. **Diagnóstico microbiológico** – texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.

LANGONI, H., et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n12/04.pdf>>. Acesso em: 11 de junho de 2014.

LORENZI, V.; MUSELLI, A.; BERNARDINI, A. F.; BERTI, L.; PAGES, J. M.; AMARA, L.; BOLLA, J.M. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug –Resistant Isolates from Gram-Negative Species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 5, p. 2209–2211, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

MÂCEDO, A.R.; LAGE, A.P.; GUEDES, R.M.C. **Deteção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos**. Engormix. 2012. Disponível em: pt.engormix.com/MA-suinocultura/administração/artigos/deteção-cepas-patogenicas-pela-t1008/124-p0.htm. Acesso em: 10/08/2014.

MACHADO, L. S. **PCR na deteção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* patogênica em frangos de corte com aerossaculite pela Inspeção Federal**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense. 2010. 63p.

MOURA, L. B.; FERNANDES, M.G. A incidência de infecções urinárias causadas por *E. coli*. **Revista Olhar Científico**, v. 1, n. 2, p. 411-426, 2010.

MARTINS, R.P., et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.1, p.181-187, jan./mar. 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/5085/6552>>. Acesso em: 12 mai. 2014.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTIS, R.; BROWN, P. K.; ARNE, P. K.; BRECA.; DESAUTELS, R.; FAIRBROTHER, J. M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**. v. 71, n.1, p. 536-540. 2003.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; LEITE, D. S.; LANGONI, H.; JÚNIOR, F. G.; VICTÓRIA, C. F.; LISTONI, J. P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.5, p.724-731, 2006.

RIZZO, P. V.; MENTEN, J.F.M.M.; RACANICCI, M.C.; TRALDI, A.B.; SILVA, C.S.; PEREIRA, W.Z.P. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 801-807, 2010.

TOLEDO, G. I. S. P.; COSTA, P. T. C.; SILVA, L. P.; PINTO, D.; FERREIRA, P.; POLETTO, C. J. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p 1760-1764, 2007.

WIKIPÉDIA. 2014. Disponível em: [http: pt.wikipedia.org/wiki/kefir](http://pt.wikipedia.org/wiki/kefir). Acesso em: 25/09/2014.