

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Fitoterápico e sua ação antibacteriana: uma alternativa para o tratamento de
diarreia neonatal bovina**

Adriane Dalla Costa de Matos

Pelotas, 2020

Adriane Dalla Costa de Matos

Fitoterápico e sua ação antibacteriana: uma alternativa para o tratamento de diarreia neonatal bovina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M425f Matos, Adriane Dalla Costa de

Fitoterapico e sua ação antibacteriana: uma alternativa para o tratamento de diarreia neonatal bovina / Adriane Dalla Costa de Matos; Marcio Nunes Corrêa, orientador. — Pelotas, 2020.
33 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Bezerros. 2. Bovinocultura. 3. Pecuária de leite. 4. Antibioticoterapia. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Título.

CDD : 636.213

Adriane Dalla Costa de Matos

Fitoterápico e sua ação antibacteriana: uma alternativa para o tratamento de diarreia neonatal bovina

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12/02/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Josiane de Oliveira Feijó
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rubens Alves Pereira
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico esse trabalho aos meus pais.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por todas as bênçãos e proteção em mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais Auri de Matos e Irene Dalla Costa de Matos, pelo apoio e pela dedicação que tiveram em todos os anos da minha criação, e por sempre estarem disponíveis para me ajudar, apoiar e a incentivar a conclusão deste sonho.

Aos meus irmãos Alex, Arlei, Aline e Andreza por acreditarem, torcerem e me darem todo o apoio para continuar a buscar sempre meus sonhos.

A Guta Garcia pela paciência e amizade, por sempre estar disponíveis nos momentos difíceis e por vibrar com minhas conquistas.

As minhas amigas Larissa, Andreza, Bruna e Maria Carolina pela amizade e por deixarem os meus dias mais alegres.

A Silvia Ladeira e Amanda Krummenauer pela companhia de laboratório, disponibilidade, ensinamentos e ajuda para realização deste projeto.

A Karen Freitas pelo empenho e boa vontade.

Ao meu orientador, Marcio Nunes Corrêa, que tornou possível a elaboração deste projeto, por sempre acreditar em minha capacidade, além do incentivo para nunca desistir.

A Viviane Rohrig Rabassa e Josiane Feijó pelo auxílio durante o percurso.

Ao Antônio por todo auxílio e por estar sempre disponível mesmo aos finais de semana.

Ao grupo NUPEEC, grande família, onde fiz grandes amigos que vou levar para o resto de minha vida.

A agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro, por me possibilitar a realização deste grande desafio e também pela possibilidade da conclusão deste trabalho.

Agradeço.

***“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos
sempre depois de cada queda”***

Oliver Goldsmith

Resumo

MATOS, Adriane Dalla Costa. **Fitoterapico e sua ação antibacteriana: uma alternativa para o tratamento de diarreia neonatal bovina.** 2020. 33f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A grande incidência de diarreia neonatal e a falta de diagnóstico dificulta o tratamento efetivo desta enfermidade, aumentando assim os microrganismos que apresentam resistência as moléculas utilizadas na rotina clínica das propriedades. A fitoterapia vem mostrando-se uma alternativa eficaz e sustentável ao uso de moléculas químicas nas diferentes áreas da medicina humana e animal. A utilização de preparados de folhas e frutos no combate de doenças supre não somente as questões de sustentabilidade e produção orgânica, mas também a demanda de novas moléculas para o combate de microrganismos resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* de dois extratos obtidos da casca do fruto da Planta A frente a cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* Isoladas em laboratório provenientes das fezes de bezerras acometidas por diarreia neonatal. Foram utilizados extratos hidroalcolico 70% e aquoso 1% extraídos a partir da casca do fruto. A concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos foram determinadas através da verificação de crescimento ou não de microrganismos. Ambos extratos se mostraram eficientes frente as cepas de *Salmonella sp.*, ambos não demonstraram eficiência frente as diferentes cepas de *E. coli* em nenhuma das concentrações testadas. Sendo assim, o estudo inicial demonstra potencial antimicrobiano dos extratos podendo futuramente ser uma alternativa as moléculas químicas utilizadas na rotina clínica.

Palavras-chave: Bezerros. Bovinocultura. Pecuária de leite. Antibioticoterapia.

Abstract

MATOS, Adriane Dalla Costa. **Diarrhea in calves in Southern Brazil**. 2020. 33f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

The high incidence of neonatal diarrhea and the lack of diagnosis hinder the effective treatment of this disease, thus increasing the microorganisms that show resistance to the molecules used in the clinical routine of the properties. Phytotherapy has been shown to be an effective and sustainable alternative to the use of chemical molecules in different areas of human and animal medicine. The use of leaf and fruit preparations to fight diseases not only addresses the issues of sustainability and organic production, but also the demand for new molecules to fight microorganisms resistant to the drugs available on the market. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the in vitro effects of two extracts obtained from the peel of the fruit of Plant A against strains of *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* isolated in the laboratory from the feces of calves affected by neonatal diarrhea. Hydroalcoholic extracts 70% and aqueous 1% extracted from the fruit peel were used. The minimum bactericidal concentration (CBM) of the extracts was determined by checking the growth or not of microorganisms. Both extracts proved to be efficient against the strains of *Salmonella sp.*, both did not show efficiency against the different strains of *E. coli* in any of the tested concentrations. Thus, the initial study demonstrates the antimicrobial potential of the extracts and may in the future be an alternative to the chemical molecules used in the clinical routine.

Keywords: Calves. Cattle farming. Dairy farming. Antibiotic therapy.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequências dos <i>primers</i> e condições utilizadas neste estudo....	21
Tabela 2	Resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	23
Tabela 3	Resultado Concentração Bactericida Mínima dos extratos Hidroalcoólico e Aquoso de Planta A	24

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Artigo.....	16
3 Considerações Finais.....	29
Referências.....	30

1 Introdução

Ao nascerem os neonatos bovinos necessitam da transmissão da imunidade passiva através do colostro materno, pois, pelo tipo de placentação epiteliocorial não ocorre a transferência de imunoglobulinas durante a gestação. (HULBERT; MOISÁ, 2016), entretanto, os índices de falhas nessa transferência de anticorpos ainda são altos nas propriedades leiteiras, elevando a mortalidade neonatal e conseqüentemente os prejuízos na produção. (WEAVER et al., 2000; USDA, 2007)

O ambiente, exerce uma grande influência sobre a incidência de enfermidades neonatais (SVENSSON; LIBERG, 2006), pois determina o grau de exposição dos neonatos a microrganismos patogênicos e a fatores climáticos, que predisõem os animais a desenvolverem enfermidades.

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA, 2011) aproximadamente 92% das causas de mortalidade dos bezerros são devido a doenças e fatores climáticos, sendo essa taxa de mortalidade de 7,6% do total do rebanho durante o aleitamento. No Brasil, esse índice de mortalidade deve ser maior devido a menor adoção de tecnologia pela grande parte dos produtores, com índice de mortalidade de até 5% entre o nascimento até o terceiro mês de idade é considerado aceitável (ROY, 1990). Outro estudo relata que a morte de bezerros durante o aleitamento chega aos 8,4% e que 52% destes óbitos se devem a diarreia causada por dois principais motivos, a falta de higienização do ambiente e utensílios e a ingestão inadequada de colostro.

Com isso, a diarreia e suas conseqüências como acidose e desidratação, são responsáveis pela principal causa de mortalidade de bezerros antes do desaleitamento (LEAL et al., 2008; NAYLOR; ZELLO; ABEYSEKARA, 2006).

Estima-se que, mundialmente, as perdas relacionadas a diarreia neonatal estão entre 20% e 52%, e tenham custo aproximado de US\$ 33,50 bezerro/ano, elevando os custos da produção e resultando em prejuízos econômicos (SANTOS et al., 2015). Os prejuízos estão ligados a perda de animais por óbito, gastos com tratamento, perda de peso, comprometimento do futuro desempenho dos animais, acarretando em

bezerras com a capacidade reprodutiva reduzida (AGHAKESHMIRI; AZIZZADEH, 2017).

A campo é difícil obter um diagnóstico preciso do agente etiológico que está desencadeando o quadro clínico. Além disso, na maior parte dos casos mais de um microrganismo está desencadeando o quadro simultaneamente (LACERDA, 2014). Segundo SOARES 2013, a diarreia de origem infecciosa ocorre pela ação de microrganismos oportunistas encontrados no meio ambiente, com estes provocando a enterite quando os animais apresentam quedas na imunidade.

Os principais microrganismos envolvidos na etologia da diarreia são as bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*), vírus (coronavírus, rotavírus, torovírus, norovírus) e protozoários (*Cryptosporidium sp.* e *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii*) podendo ser agentes causadores da infecção, juntos ou isolados. (FAGAN; DWYER; QUINLAN, 1995; MILLEMANN, 2009). As infecções por *Salmonella*, principalmente pelos sorotipos Dublin e Typhimurium, são as causas mais importantes de diarreias em bezerros, um estudo revelou que, na Inglaterra, 12% dos surtos de diarreia neonatal em bezerros estavam relacionados aos sorotipos de *Salmonella* (SANTOS et al., 2002). Já no Brasil, os poucos estudos sobre o assunto revelam taxa de prevalência de bactérias do gênero *Salmonella* entre 3,43 e 10,6% em amostras de fezes de bezerros leiteiros com diarreia, com predomínio do sorotipo Dublin (LANGONI et al., 2004; PEREIRA et al., 2004).

Além da *Salmonella spp.* outro microrganismo de grande importância na diarreia neonatal de bovinos é a *Escherichia coli*, uma enterobactéria gram-negativa e anaeróbica facultativa. A *E. coli* faz parte da microbiota residente do lúmen intestinal e não causa dano ao indivíduo, entretanto, cepas patogênicas podem causar enfermidades em variados vertebrados (STELLA, 2009). Os principais fatores de patogenicidade são: as fímbrias e exotoxinas, conforme o mecanismo patogênico as cepas de *E. coli* podem ser divididas em 3 grupos: enterotoxigênicas (ETEC), enteropatogênicas (EPEC) e enterro-hemorrágica (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).

A homeostase do animal é essencial para a sua sobrevivência, manter o balanço eletrolítico nos fluidos e nos tecidos de um organismo é fundamental para o equilíbrio homeostático em vários aspectos relacionados ao metabolismo de absorção (DAVIS, C. L. ; DRACKLEY, 1998). Independente da diarreia e da sua etiologia, a intensidade de desidratação pode chegar até 13% de perdas de líquidos do peso

corpóreo animal em 24 horas. Além da perda de água pode ocorrer déficit de íons do organismo, como o bicarbonato de sódio, cloreto e potássio através da defecação (RAVARY- PLUMIOEN, 2009).

Levando em consideração as diversas causas primárias e secundárias da diarreia, é de fundamental importância que o correto diagnóstico seja realizado anterior ao tratamento, tendo em vista que a resistência dos microrganismos às moléculas antimicrobianas disponíveis no mercado vem se tornando cada dia maior, e uma preocupação não só na saúde animal, mas também na humana. O uso irracional de antibióticos fez com que bactérias previamente suscetíveis, se tornassem resistentes. São inúmeros os problemas acarretados devido a este quadro de resistência e a descoberta de novos compostos antimicrobianos é de importância para a saúde pública.

A utilização de plantas medicinais para tratamento de enfermidades é conhecida desde as mais antigas civilizações. A herança cultural e o conhecimento empírico da comunidade em relação a utilização de plantas para tratamento de enfermidades são responsáveis pela aceitação da população ao uso de fitoterápicos na terapêutica humana e animal (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006).

Nesse cenário, fatores econômicos e sociais vêm colaborando com o desenvolvimento de práticas de saúde, que envolvem o uso de plantas medicinais empregadas na medicina popular, em função das expectativas de cura e de prevenção de doenças (WERKMAN et al., 2008).

A biodiversidade da flora brasileira instiga a busca por novos compostos isolados da vegetação em nosso país. Fitoterápicos como ácido acetilsalicílico e a vincristina, vem sendo amplamente utilizados como anti-inflamatório e anticancerígeno (BRANDÃO et al., 2010).

A pesquisa de antibióticos em plantas medicinais é uma alternativa para descoberta de novos agentes capazes de sensibilizar bactérias multirresistentes. Entre os constituintes das plantas, os polifenóis têm recebido muita atenção, nos últimos anos, devido à sua diversidade funções biológicas. A atividade antimicrobiana dos polifenóis, taninos e flavonóides, está bem documentado (Ahmad e Beg, 2001; Machado et al., 2003; Naz et al., 2007; Shan et al., 2007).

Os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular que estão presentes em diversas plantas, incluindo pericarpo de frutas, estas possuem características atividades antimicrobianas (Machado et al., 2003; Voravuthikunchai et

al., 2004). Frutos, cascas e raízes de Planta A tem sido comumente usada em remédios fitoterápicos por curandeiros e na medicina tradicional para o tratamento de diarreia e disenteria (Ahmad e Beg, 2001; Braga et al., 2005; Voravuthikunchai et al., 2005; Reddy et al., 2007). Atualmente, estudos científicos *in vitro* e *in vivo* com diferentes preparações de planta têm respaldado suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012). Estas atividades têm demonstrado o potencial terapêutico de seu fruto, de partes como a casca, folhas e sementes.

Segundo (MENEZES; PINTO; CORDEIRO, 2008), a Planta A é utilizada como adstringente, hemostática, antidiabética, anti-helmíntica, antidiarréica, antisséptico e antiviral. A casca do fruto apresenta princípios ativos antimicrobianos efetivos contra microrganismos Gram positivos e leveduras (PEREIRA et al., 2006). O extrato metanólico da planta demonstrou potencial de inibição de bactérias como *Staphylococcus aureus* (PRASHANTH; ASHA; AMIT, 2001).

O perfil químico dos extratos da casca demonstrou que entre os seus principais fitoconstituintes estão os flavonóides (apigenina e narigenina), antocianinas, taninos (ácido gálico e elágico), alcalóides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados (ácido púnico) e o ácido ursólico (LANSKY; NEWMAN, 2007). Por ser rica em polifenóis também apresenta efeito antisséptico (NEGI; JAYAPRAKASHA; JENA, 2003). Segundo Haslam (1996) os compostos fenólicos agem inespecificamente sobre os microrganismos, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos e diminuindo os lipossacarídeos e as proteínas do biofilme dental.

Baseado nas considerações apresentadas, a hipótese deste estudo é de que a utilização de extratos da casca de Planta A é capaz de inibir *in vitro* o crescimento de bactérias isoladas de animais que foram acometidos por diarreia. Portanto, o objetivo foi testar *in vitro* diferentes concentrações de duas extrações utilizando a casca do fruto para verificar atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp.

2 Artigo

Fitoterápico e sua ação antibacteriana: uma alternativa para o tratamento de diarreia neonatal bovina

Matos D.C.A; Corrêa N.M ; Rabassa R.V

Submetido à revista Nactural Product Research

Fitoterápico e sua ação antibacteriana: uma alternativa para o tratamento de diarreia neonatal bovina

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* de dois extratos da casca da Planta A frente a cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* isoladas de bezerras acometidas por diarreia neonatal. Para avaliação do efeito antibacteriano foram utilizadas duas cepas isoladas de bezerros e duas cepas ATCC de *Escherichia Coli* e *Salmonella sp.* Após passarem pelo teste de suscetibilidade a antimicrobianos, as cepas bacterianas foram semeadas em microplacas em meio de infusão cérebro-coração e adicionados os extratos nas concentrações de 10, 6, 4, 2.4, 1.2 e 0.2%. As placas foram incubadas por 24h em estufa bacteriológica a 35°C e a concentração bactericida mínima dos extratos foi determinada por crescimento ou não de colônias bacterianas nas diferentes concentrações. Ambos extratos se mostraram eficientes frente as cepas de *Salmonella* e não eficientes quanto a *Escherichia coli*, demonstrando o efeito bactericida da planta e seu potencial uso frente a bactérias resistentes a antibióticos.

Palavras-chave: Bezerros; Pecuária leiteira; Bovinocultura.

INTRODUÇÃO

Apesar da alta relevância desta doença e da constante busca por novas alternativas terapêuticas antimicrobianas (CONSTABLE; GRÜNBERG; CARSTENSEN, 2009), não se observam reflexos consistentes na redução da taxa de mortalidade de bezerros neonatos nos últimos anos.

Atualmente a preocupação com bactérias resistentes a antibióticos se exacerbou, devido a redução do número de moléculas eficientes no combate aos microrganismos. Além disso, o conhecimento sobre os efeitos tóxicos dos resíduos do antibiótico em produtos de origem animal é uma crescente preocupação dos consumidores (MOTA et al., 2005). Esta preocupação da sociedade, aliado à necessidade de produzir com maior segurança alimentar vem fazendo com que a discussão sobre alternativas ao uso de antibióticos seja abordada, tanto na saúde humana quanto no animal.

A pecuária leiteira é uma das atividades mais importantes para a economia brasileira. Tal setor é desafiado por diversos limitantes sendo a alta taxa de mortalidade de bezerras no primeiro mês de vida, um dos maiores gargalos nessa cadeia produtiva (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA, 2007). A fase de cria e recria de bezerras dentro do sistema de produção leiteira por vezes é negligenciada, pois, trata-se de uma categoria que não traz resultados monetários a curto prazo. Com isso o tempo e cuidados despendido a essa fase da criação é subestimado, doenças neonatais configuram-se como pontos críticos do sistema, pois prejudicam o potencial produtivo com reflexos negativos na primeira gestação, aumentando ainda mais os custos de produção (VIRTALA et al., 1996).

A falha na colostragem e nos manejos do neonato podem facilitar a ocorrência de doenças como onfalobites, pneumonias e diarreia. A diarreia é uma enfermidade multifatorial resultante da interação entre agentes infecciosos e fatores não-infecciosos relacionados à alimentação, condições de higiene dos criatórios, densidade populacional, manejo, condições sanitárias das mães, entre outros (BARRINGTON; GAY; EVERMANN, 2002).

Este cenário requer controle sobre o uso dos antimicrobianos existentes, além de pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas. Desta forma, torna-se crucial elaborar alternativas de tratamento antimicrobiano, como o uso de compostos fitoterápicos, que possam

ser usados de forma estratégica combatendo a proliferação de bactérias patogênicas intestinais e assim evitando o uso indiscriminado de antibióticos.

A utilização de compostos e extraídos de plantas e frutos para a obtenção de novas alternativas de antimicrobianos pode ser uma opção acessível financeiramente e que vai ao encontro da ideia de sustentabilidade produzindo com menores quantidades de moléculas químicas colaborando com a conservação da flora do país. A fitoterapia, está entre os programas preventivos e curativos e tem estimulado pesquisas que avaliam os extratos de plantas, devido ao seu menor efeito citotóxico e custo, além da procura por maior prevenção e ação curativa (PINTO, et al., 2015). No ano de 2011 a ANVISA listou mais de 60 produtos naturais que podem ser usados para tratamento de diversas doenças, entre eles estão alguns dos comumente utilizados, como aloe vera (babosa), calêndula e cravo, além destas outras plantas que demonstram propriedades antimicrobiana é pertencente à família X, cultivada em todo o mundo, a Planta A, tem sido estudada como uma alternativa aos antimicrobianos sintéticos (JAIN; NAFIS, 2011; MOORTHY et al., 2013; RAJAN et al., 2013). Seus componentes principais são alcaloides, taninos, compostos fenólicos e flavonoides (LANSKY; NEWMAN, 2007), essas possivelmente são responsáveis pela sua atividade terapêutica. Assim, a ação antimicrobiana desta planta pode ser uma alternativa eficiente no combate contra bactérias causadoras de diarreia neonatal em bovinos.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos *in vitro* de dois extratos obtidos da casca do fruto da Planta A frente a cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* isoladas de bezerras acometidas por diarreia neonatal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do estudo foi utilizado o pó proveniente da casca do fruto da Planta A seco e triturado (Spacegreen, Curitiba, BR). Foram realizados dois tipos de extração para os testes, hidroalcolica e aquosa. Para extração hidroalcolica 70% foram utilizados 30g de material em 190mL de álcool etílico P. A. e 80 mL de água destilada sob agitação mecânica constante por 24 horas em temperatura ambiente.

Posteriormente foi efetuado filtração a vácuo três vezes consecutivas para melhor filtração da solução, sendo o volume filtrado levado ao rotaevaporador, em temperatura de 60°C e secagem em estufa a 37°C por 24 horas após, com a utilização de pistilo e graal, o produto foi macerado até resultar um pó o qual foi armazenado à temperatura ambiente para posterior utilização.

Para a extração aquosa 1% foram adicionadas 5g da matéria prima em 500 mL de água destilada mantendo em agitação mecânica por 2 horas em temperatura ambiente, após a solução foi filtrada e colocada em estufa à 40°C durante 48h até a secagem completa.

Para pesquisa e caracterização das cepas de *Salmonella sp.* e *Escherichia coli* utilizadas neste estudo, foi feito o isolamento de 100 amostras de fezes de bezerros neonatos criados em sistema de baias individuais suspensas, acometidos por diarreia, provenientes de uma propriedade localizada no sul do Rio Grande do Sul (coordenadas geográficas: 32,8° 16' S, 52,8° 32' L). Em laboratório as cepas de *Salmonella sp.* e *Escherichia coli* foram identificadas de acordo com a técnica de QUINN et al., (1994).

As amostras suspeitas de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* através da caracterização bioquímica foram confirmadas através da técnica de PCR. A extração do DNA genômico dos isolados considerados suspeitos para *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Green; Sambrook (2012). A confirmação molecular dos isolados de *E. coli* foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), o gene *uspA* onde foi utilizado para confirmação de espécie e gênero, gerando um fragmento de 884 pares de base (pb) (CHEN; GRIFFITHS, 1998).

Já para a confirmação do gênero *Salmonella spp.* o gene *hlyA* foi utilizado, gerando um fragmento de 413 pb (CRÂCIUNAŞ et al., 2012). Nos isolados confirmados como *E. coli*, foram pesquisados por PCR os genes de virulência *eae* (384 pb), *stx1* (180 pb), *hlyA* (534 pb) e *est1a* (157 pb), que codificam para a intimina (presente em EPEC e STEC), toxina Stx1 (presente em STEC), hemolisina (presente em EHEC) e toxina termoestável A (presente em ETEC), respectivamente. Os *primers*, condições e referências utilizadas estão descritos na tabela 1. Para a realização da PCR foi utilizado 12,5 µL de *Taq polimerase master mix 2x* (Cellco®), 8,5 µL de água para PCR (Ludwig Biotec®), 10 pmol dos *primers* (Exxtend®) específicos 10 µg/mL de DNA, totalizando um volume final de 25 µL. Após a amplificação em termociclador LGC XP *Cycler* (Bioer) os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (para fragmentos maiores que 200 pb) e 2% (para fragmentos menores que 200 pb) com um marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen®). Então, os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador (Loccus®, L-Pix Touch).

Tabela 1. Sequências dos *primers* e condições utilizadas neste estudo

Gene	Proteína	Sequência dos <i>primers</i>	Tam. do <i>amp.</i> (pb)	Número de ciclos	Temp. anel. (° C)	Referência
hilA	<i>Hyper Invasibility</i>	F- GCGAGATTGTGAGTAAAAACAC C R- CTGCCCGGAGATATAATAATCG	413	35	63	Craciunas et al. (2012)
uspA	<i>Universal stress protein</i>	F-CCGATACGCTGCCAATCAGT R-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	884	30	70	Chen; Griffiths (1998)
eae	Intimina	F-GACCCGGCACAAGCATAAGC R-CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	35	60	Paton; Paton (1998)
stx1	Shiga toxina 1	F- ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R-AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	35	60	Paton; Paton (1998)
estIa	Toxina termoestável A	F- CCTCTTTTAGCAGACACTGAATC ATTG R- CAGGCAGGATTACAACAAAGTT CACAG	157	30	63	Mueller et al. (2007)
hlyA	Hemolisina	F- GCATCATCAAGCGTACGTTCC R- AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	35	60	Paton; Paton (1998)

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foram utilizados os seguintes microrganismos: *Salmonella* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922 e os isolados *E. coli* e

Salmonella sp. Para a determinação da concentração bactericida mínima dos extratos, foram utilizadas placas de 96 poços conforme metodologia descrita no manual (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition) do Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (CLSI, 2012). Foram adicionados 50 µL caldo cérebro-coração em concentração dupla em todos os poços da placa, em seguida foram adicionados 50 µL da solução fitoterápica nas seguintes diluições: 10%, 6%, 2,4%, 1,2% e 0,6% nas linhas B, C, D, E e F da placa respectivamente. Após, foram adicionadas 10 µL da suspensão bacteriana das quatro cepas em água salina estéril na escala de 0,5 de MacFarland, o que corresponde aproximadamente $2,5 \times 10^4$ UFC/mL de *Salmonella* ATCC adicionada nas colunas 1 e 2 da placa; $3,7 \times 10^6$ UFC/mL de *Salmonella typhimurium* adicionadas nas colunas 3 e 4; $5,3 \times 10^6$ UFC/mL de *E. coli* ATCC adicionadas nas colunas 5 e 6 da placa e $1,04 \times 10^7$ UFC/mL de *E. coli* nas colunas 7 e 8. As linhas A e G das placas foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48 horas. Ambos os extratos foram testados em quadruplicata.

Para avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), decorridas 24 e 48 horas de incubação das placas, 10 µL de cada poço da placa foi re-semeado em placas de ágar cérebro-coração e incubados em estufa bacteriológica à 35°C por 24h, após, as placas foram analisadas observando-se a ausência ou presença de crescimento bacteriano. Foi considerada como CBM a menor concentração dos extratos capaz de exercer efeito bactericida nas placas contendo meio BHI.

A fim de verificar a resistência bacteriana, as cepas de *E. coli* e *Salmonella sp.* isoladas foram submetidas ao teste sensibilidade à fármacos químicos rotineiramente utilizados na clínica veterinária, sendo: ampicilina, enrofloxacina, ciprofloxacino, sulfazotrin, amoxicilina com clavulanato e cefalotina através da técnica de difusão em disco sobre ágar, os resultados foram comparados a tabela (BrCAST ,2017).

RESULTADOS

Através da técnica de PCR foram possíveis confirmar 12 cepas do gênero *Escherichia coli* e uma cepa do gênero *Salmonella typhimurium*.

O teste de antibiograma pela técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton demonstrou que as cepas ATCC de ambas bactérias são sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O isolado de *Salmonella Typhimurim* é sensível a Cefalotina e demonstrou resistência aos demais antibióticos utilizados na rotina clínica, já a cepa de *Escherichia Coli* possui resistência

bacteriana aos antibióticos químicos comerciais: ampicilina, enrofloxacina, ciprofloxacino, sulfazotrim e amoxicilina com clavulanato e suscetibilidade a cefalotina.(tabela 2).

Tabela 2: Resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos

	Enrofloxacina		Ciprofloxacina		Ampicilina		Sulfazotrim		Cefalotina		Amoxicilina + Clavulanato	
	halo(mm)	S/R	halo(mm)	S/R	halo(mm)	S/R	halo(mm)	S/R	halo(mm)	S/R	halo(mm)	S/R
E. coli ATCC 25922	36	S	34	S	30	S	33	S	25	S	26	S
E. coli 1407	14	R	13	R	-	R	-	R	22	S	-	R
Salmonella Typhimurium	16	R	13	R	-	R	-	R	20	S	-	R
Salmonella ATCC 14028	42	S	40	S	34	S	39	S	33	S	34	S

Legenda: S- Sensível; R- Resistente

Os testes de CBM demonstraram que ambos extratos de foram eficientes frente as cepas de *Salmonella spp.*, A extração hidroalcoólica possui maior efetividade na ação bactericida frente a cepas de *Salmonella typhimurium*, sendo eficiente nas concentrações de 10, 6 e 4 % nos isolados que possuem resistência conhecida a antimicrobianos químicos comerciais e nas concentrações de 10, 6, 4, 2,4 e 1,2% na cepa *Salmonella ATCC* (Tabela 3).

A extração aquosa testada também se mostrou eficiente inibindo o crescimento de *Salmonella typhimurium* resistente na concentração de 10% e nas concentrações 10%, 6% e 4% na cepa *Salmonella ATCC*, possivelmente pelo fato do princípio ativo ser diluído em maior quantidade de solvente nesta extração.

Em contrapartida frente as cepas de *E. coli* o princípio não foi eficiente não demonstrando crescimento em todas as concentrações testadas dos dois extratos utilizados. (Tabela 3)

Tabela 3: Resultado Concentração Bactericida Mínima dos extratos Hidroalcoólico e Aquoso de Planta A

ESPÉCIE	Concentrações	Salmonella Resistente	Salmonella ATCC	E coli Resistente	E coli ATCC	
Planta A	EXTRAÇÃO					
	Hidroalcoólico ^a	10%	-	-	+	+
		6%	-	-	+	+
		4%	-	-	+	+
		2,40%	+	-	+	+
		1,20%	+	-	+	+
		0,60%	+	+	+	+
	Aquosa	10%	-	-	+	+
		6%	+	-	+	+
		4%	+	-	+	+
		2,40%	+	+	+	+
		1,20%	+	+	+	+
		0,60%	+	+	+	+

Legenda: (-) sem crescimento bacteriano; (+) com crescimento bacteriano.

DISCUSSÃO

Na última década os fitoterápicos têm ganhado uma importância significativa, devido ao seu sucesso no combate a microrganismos que demonstram resistência a antimicrobianos (WERKMAN et al., 2008). O resultado positivo do extrato da Planta A frente a cepas de *Salmonella spp.* pode indicar uma alternativa eficaz no controle de diarreia neonatal. O uso destes compostos naturais representa uma forma sustentável de tratamento, diminuindo a necessidade da utilização de princípios sintéticos e minimizando os resíduos provenientes destes nos produtos de origem animal.

A resistência bacteriana aos antibióticos comerciais vêm sendo um problema de grande magnitude tanto na saúde humana quanto no animal. No presente estudo foi possível constatar que grande parte das cepas de *Salmonella spp.* isoladas apresentaram resistência aos principais antimicrobianos utilizados na rotina clínica (tabela 2). Um estudo realizado por Catão et.al.(2006), comparando a eficiência de antimicrobianos utilizados na rotina de clínica médica aos resultados apresentados pelo extrato etanólico a 10%, avaliando 17 cepas de *Staphylococcus*

aureus de origem humana ambulatorial e registraram que o extrato da Planta A foi eficiente em 100% das cepas, as quais 67% apresentavam resistência a penicilina e ampicilina.

O efeito antimicrobiano do extrato da casca da planta pode estar ligado aos seus altos níveis de taninos, principalmente a punicalagina. Os taninos possuem efeito inibitório sobre bactérias e fungos, sendo três mecanismos descritos como forma de ação frente os microrganismos: inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a complexação dos substratos as enzimas; ação sobre as membranas celulares dos microrganismos modificando o seu metabolismo (MELLO e SANTOS, 2002), complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos.

Estudos realizados por Machado et al., (2003) avaliando o potencial antimicrobiano de 14 extratos de plantas tradicionais brasileiras no tratamento de doenças infecciosas frente a microrganismos de importância médica e multirresistentes demonstraram que os extratos da Plants A foram eficazes contra cepas de *Staphylococcus aureus*, nosso trabalho demonstra que além das cepas já estudadas, os extratos também são eficazes frente a cepas de *Salmonella spp.*

A não inibição das cepas de *E. coli* neste estudo pode ser explicada pelos extratos de plantas serem geralmente uma mistura de compostos ativos e inativos e suas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes variarem de acordo com o local, período e tipos de solventes utilizados na extração dos princípios ativos, pois estes podem interferir na atividade biológica do extrato (MELO et al., 2012).

Outro fato que possivelmente justifique esse resultado é a *Escherichia coli* possuir uma via secundária denominada via de Entner-Doudoroff capaz de conservar uma parte da energia sob a forma de ATP. Os taninos presentes no extrato quelam importantes íons metálicos como Fe, Cu, Zn e Mg, sendo o último importante cofator que atua na fosforilação da glicose no citosol na fase preparatória da glicólise, inibindo assim o seu início. Sendo assim a *E. coli* tem capacidade de obtenção de ATP para manutenção por uma via secundária.

Apesar dos resultados positivos *in vitro* das extrações frente as cepas de *Salmonella spp.* isoladas de bezerras acometidas por diarreia neonatal, são necessários mais estudos para o desenvolvimento de fármacos utilizando este princípio ativo, tendo em vista que, a via de aplicação pode influenciar na farmacocinética e farmacodinâmica do extrato.

CONCLUSÃO

Os extratos da Planta A mostraram-se eficientes *in vitro* frente as cepas de *Salmonella spp.* sendo que a extração hidroalcoólica demonstrou-se a melhor forma de utilização. Quanto a *E. coli* este princípio não apresentou resultados satisfatórios.

REFERENCIAS

- BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 7–34, 2002.
- BERGE, A. C. B. et al. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4707–4714, 2009.
- BLUM, J. W. Nutritional physiology of neonatal calves. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 1–2, p. 1–11, 2006.
- BrCAST - Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Versão 6.0 (Janeiro de 2017)
- CALLAN, R. J.; GARRY, F. B. Biosecurity and bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 57–77, 2002.
- CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 369–371, 1998.
- CHO, Y. IL et al. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 375–385, 2013.
- CONSTABLE, P. D.; GRÜNBERG, W.; CARSTENSEN, L. Comparative effects of two oral rehydration solutions on milk clotting, abomasal luminal pH, and abomasal emptying rate in suckling calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 296–312, 2009.
- CRÂCIUNAŞ, C. et al. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hlyA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. **Journal of Environmental Management**, v. 95, n. SUPPL., p. 2010–2013, 2012.
- FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13–36, 2009.
- FRANCO, J. et al. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 191–194, 2005.
- LANGONI, H. et al. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 313–319, 2004.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371–376, 2005.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Resanim Sci**, v. 42, p. 465–470, 2005.

QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London.

SVENSSON, C.; LIBERG, P. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 1, p. 43–53, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. Microbiologia. In: 4° editio ed. [s.l: s.n.]. p. 718 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA. No Title. 2007.

VIRTALA, A. M. K. et al. The Effect of CalfhooD Diseases on Growth of Female Dairy Calves during the First 3 Months of Life in New York State. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1040–1049, 1996.

3 Considerações Finais

Com base nos recentes estudos utilizando a Planta A é possível afirmar que a mesma possui atividade antimicrobiana. Baseado nos dados apresentados em nosso trabalho, é possível afirmar que as concentrações de 10%, 6%, 4% e 2,4 % do extrato hidroalcoólico exerce efeito antimicrobiano quando utilizado frente a cepas de *Salmonella spp*, enquanto que o extrato aquoso apenas exerce efeito bactericida em concentrações mais altas (10%, 6% e 4%), porém não podemos afirmar sua ação sobre a *Escherichia coli*, pois neste estudo ambos extratos não demonstraram eficiência quando testados frente à estas cepas.

Os resultados encontrados demonstram potencial utilização das extrações como uma alternativa ao uso dos antibióticos frequentemente utilizados na rotina clínica das propriedades, no entanto, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para esclarecer o mecanismo de ação dos compostos e assim tornar uma alternativa viável para utilização em propriedades diminuindo o uso de moléculas sintéticas e minimizando os problemas desencadeados pela resistência bacteriana.

Referências

ABE, M. et al. **Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes.** Virus Research, v. 144, n. 1–2, p. 250–257, 2009.

AGHAKESHMIRI, F.; AZIZZADEH, M. **Effects of neonatal diarrhea and other conditions on subsequent productive and reproductive performance of heifer calves.** p. 107–112, 2017.

AZOLA, J. M. **Genes de virulência e perfil de susceptibilidade a extratos vegetais de isolados de Escherichia coli enterotoxigênicas (ETEC), shigatoxigênicas (STEC) e enteropatogênicas (EPEC) em bezerros.** 2016.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. **Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases.** Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice, v. 18, n. 1, p. 7–34, 2002.

BENESI, F. J. **Síndrome diarréia dos bezerros.** Revista CRMV-ES, v. 2, p. 10–13, 1999.

BRANDÃO, H. N. et al. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.** Quimica Nova, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

CALLAN, R. J.; GARRY, F. B. **Biosecurity and bovine respiratory disease.** Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice, v. 18, n. 1, p. 57–77, 2002.

COSTA J.R, M.; SILVA.C.M, L. **Boas Praticas de Manejo Bezerros Leiteiros.** In: FUNEP. Jaboticabal/ SP: [s.n.]. p. 51.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. **Patotipos de Escherichia coli causadores de diarréia em bezerros: Uma atualização.** Pesquisa Veterinaria Brasileira, v. 34, n. 9, p. 811–818, 2014.

DAVIS, C. L. ; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition, and management of the young calf.** Iowa state University press, p. 303–339, 1998.

FAGAN, J. F.; DWYER, P. J.; QUINLAN, J. G. **Factors that may affect the occurrence of enteropathogens in the feces of diarrheic calves in Ireland.** Irish Veterinary Journal, Dublin, v. 48, p. 12–17, 1995.

FIGUEROA OCHOA, I. M.; VERDUGO RODRÍGUEZ, A. **Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp.** Revista Latinoamericana de Microbiología, v. 47, n. 1–2, p. 25–42, 2005.

GASPARETTO, J. C. et al. Mikania glomerata Spreng. e M. laevigata Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: **Estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 20, n. 4, p. 627–640, 2010.

GIBSON, D. L. et al. **AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in Salmonella Enteritidis.** Microbiology, v. 153, n. 4, p. 1131–1140, 2007.

HULBERT, L. E.; MOISÁ, S. J. **Stress, immunity, and the management of calves¹.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 4, p. 3199–3216, 2016.

JOHNSTON, R.; BUESNEL, D.; MORAN, J. Growing Heifers. NSW Agriculture, p. 1,1-3,6, 2008.

LACERDA, R. C. P. DE. **Impacto Económico Da Diarreia Neonatal Em Explorações Extensivas De Bovinos De Carne No Concelho De Moura.** 2014.

LEAL, M. L. D. R. et al. **Model for osmotic diarrhea in holstein calves.** Ciencia Rural, v. 38, n. 6, p. 1650–1657, 2008.

MILLEMANN, Y. **Diagnosis of neonatal calf diarrhoea.** Revue de Medecine Veterinaire, v. 160, n. 8–9, p. 404–409, 2009.

MONACK, D. M. et al. **Salmonella exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model.** Journal of Experimental Medicine, v. 192, n. 2, p. 249–258, 2000.

MOXLEY, R. A.; SMITH, D. R. **Attaching-effacing Escherichia coli Infections in Cattle.** Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice, v. 26, n. 1, p. 29–56, 2010.

NAYLOR, J.; ZELLO, G.; ABEYSEKARA, S. **Advances in oral and intravenous fluid therapy of calves with gastrointestinal disease.** World Buiatric Congress, n. September 2015, 2006.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. **Salmonella: A Model for Bacterial Pathogenesis.** Annual Review of Medicine, v. 52, n. 1, p. 259–274, 2001.

OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. **Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil.** Rev. Bras. Pl. Med., v.8, n.2, p.39-41, 2006.

PEREIRA, R. .; ÁVILA, F. A.; FERNANDES, S. A. **Estudo Do Perfil Epidemiológico Da Salmonelose Em Bezerros E Da Sensibilidade a Antimicrobianos Na Região De Ribeirão Preto – Sp , Brasil.** v. 20, p. 62–66, 2004.

PIANTA, C. **Diarreia neonatal de origem bacteriana em bovinos,** 1993.
 QUIGLEY, J. D. et al. **Effects of Housing and Colostrum Feeding on the Prevalence of Selected Infectious Organisms in Feces of Jersey Calves.** Journal of Dairy Science, v. 77, n. 10, p. 3124–3131, 1994.

RADOSTITS, O. M. et al. **A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses.** 10th editi ed. USA, Saunders: Elsevier Company, 2006. v. 10th edition
 RAVARY- PLUMIOEN, B. **Resuscitation procedures and life support of the newborn calf.** Revue Méd. Vét, v. 160, p. 410–419, 2009.

ROY, J. H. B. **The calf: management of health.** London.

SANTOS, P. et al. **Avaliação de tratamentos alternativos para controle de diarreia em bezerros leiteiros,** 2015.

SOARES, M. C. **Diarreia e acidose metabólica em bezerros leiteiros : efeito da composição do concentrado inicial e avaliação de probiótico.** Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”, 2013.

STELLA, A. E. **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.** Microbiologia (Madrid), 2009.

SVENSSON, C.; LIBERG, P. **The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders.** Preventive Veterinary Medicine, v. 73, n. 1, p. 43–53, 2006.

TOWNSEND, S. M. et al. **Salmonella enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences.** Infection and Immunity, v. 69, n. 5, p. 2894–2901, 2001.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA. 2011.

VAN ASTEN, A. J. A. M.; VAN DIJK, J. E. **Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 44, n. 3, p. 251–259, 2005.

VARGAS JÚNIOR, S. F. **Identification of Virulence Factors of Escherichia coli Isolates from Fecal Samples of Calves in Southern Brazil.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 45, n. 1, p. 6, 2017.

VAZQUEZ-TORRES, A. et al. **Extraintestinal dissemination CD18-expressing phagocytes.** Nature, v. 401, n. October, p. 623–626, 1999.

WEAVER, D. M. et al. **Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves.** Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine, v. 14, n. 6, p. 569–577, 2000.