

Identificação bioquímica e molecular de *Lactobacillus* spp. isolados do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos

Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from the ileum of broilers treated with or without antimicrobials

Surama Freitas Zanini^{I*} Jamili Maria Suhett Mussi^{II} Marcos Santos Zanini^I Dyeime Ribeiro Sousa^{III}
Bruna Mirelly de Souza Pessotti^{IV} João Damasceno Lopes Martins Damasceno^{IV}
Maria Aparecida da Silva^V

RESUMO

Objetivou-se caracterizar bioquimicamente e molecularmente as espécies de *Lactobacillus* spp. isoladas do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos. Utilizou-se 400 pintos de corte alojados em 25 boxes de 2m² (16 aves/boxe), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em grupos de cinco tratamentos e cinco repetições: dieta sem promotor de crescimento; dieta com promotor de crescimento; dieta com 0,4% de óleo de aroeira-vermelha (OAV); dieta com 200mg de vitamina E kg⁻¹; dieta com 0,4% OAV e 200mg de vitamina E kg⁻¹. Após a caracterização fenotípica do gênero *Lactobacillus*, foram identificadas, em ambas as metodologias, 100 amostras de *Lactobacillus* spp. sendo 20 amostras por tratamento. Os resultados bioquímicos identificaram *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* além de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Para as amostras padrão ATCC, a identificação bioquímica suscitou algumas dúvidas em relação aos seus resultados. Os resultados da identificação molecular mostraram que os *Lactobacillus* que amplificaram ambos os iniciadores (LU-1 / Lac-2) e (Laci-1 / 23-10C) são os da espécie *L. acidophilus*. As amostras que amplificaram apenas com o iniciador (LU-1 / Lac-2) tratam-se das demais espécies que compõem o grupo *L. acidophilus*. Já as amostras com o iniciador *L. fermentum* (Fer 3/Fer 4) amplificaram um fragmento de 192pb padrão para essa espécie. Conclui-se que a identificação das espécies de *Lactobacillus* spp. isoladas do íleo a partir da PCR apresentou-se mais sensível que o método bioquímico.

Palavras-chave: frangos de corte, antibióticos, *Schinus terebinthifolius* Raddi, óleo essencial, PCR.

ABSTRACT

This study aimed to characterize biochemically and molecular species of *Lactobacillus* spp. isolated from the ileum of broiler chickens treated with or without antimicrobial. A total of 400 day-old male chicks, Cobb, distributed in a randomized design in groups of five treatments and five replicates: diet without antimicrobials; diet with antimicrobials; diet with 0.4% Brazilian red pepper oil (BRP); diet with 200mg vitamin E kg⁻¹; diet with 0.4% BRP and 200mg vitamin E kg⁻¹. The biochemical results have identified *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* besides *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. For samples ATCC, the biochemical identification raised some doubts about their results. The molecular identification showed that *Lactobacillus* that amplified both primers (LU-1 / Lac-2) and (Laci-1 / 23-10C) are the species *L. acidophilus*. However, samples that amplified only with primer (LU-1 / Lac-2) are other species that constitute the group *L. acidophilus*. However, the samples with the primer *L. fermentum* (Fer 3/Fer 4) amplified a 192pb fragment pattern for this species. We conclude that the identification of species of *Lactobacillus* isolated from the ileum of PCR was more sensitive than the biochemical method.

Key words: broilers, antibiotics, *Schinus terebinthifolius* Raddi, essential oil, PCR.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa posição de destaque devido a grande eficiência para produzir carnes

^IDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), CP 16, 29500-000, Alegre, ES, Brasil. E-mail: smzanini@gmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFES, Alegre, ES, Brasil.

^{IV}Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UFES, Vitória, ES, Brasil.

^VPrograma de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos, RJ, Brasil.

de excelente qualidade, com intervalo de tempo e custos reduzidos (UBA, 2011). Um dos fatores para a obtenção da alta produtividade é utilização de antimicrobianos nas dietas, no entanto, isso causou restrições da indústria avícola brasileira, por parte de países importadores, pois esses produtos podem favorecer a resistência a antimicrobianos e acumular resíduos na carne (GODOI et al., 2008). Por isso, novos aditivos alternativos com atividades antibacterianas vêm sendo estudados, como os extratos vegetais, óleos essenciais, prebióticos e probióticos (GABRIEL et al., 2009; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011; TRAEZEL et al., 2011).

Foi demonstrado que o uso da planta *Schinus terebinthifolius* apresenta atividade antimicrobiana (MARTINEZ et al., 1996) e que óleo essencial não mostrou nenhuma toxicidade em animais e humanos (BARBOSA et al., 2007).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são ácido-láticas, do tipo bastonetes, Gram-positivos e não-esporulados com cerca de 80 espécies reconhecidas (AXELSSON, 2004), apresentam propriedades antimicrobianas, pois produz metabólitos que competem por sítios de adesão, demonstrando assim atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos (VANDEPLAS, 2010).

A identificação das espécies de acordo com critérios fisiológicos e métodos bioquímicos são notoriamente difíceis e ambíguos, pois são requeridos diferentes testes de fermentação (HAMMES & VOGEL, 1995; DE MARTINIS, 2002). Por outro lado, a identificação utilizando PCR comparada à identificação da fermentação de carboidratos, é mais precisa e rápida, pois a fermentação de carboidratos demonstra ser subjetiva devido às variações, principalmente na diferenciação das amostras de *Lactobacillus* spp. (BARROS et al., 2009).

Objetivou-se identificar bioquimicamente e molecularmente espécies de *Lactobacillus* spp. isoladas do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 400 pintos de corte, machos, da linhagem Cobb, em um período de 1 a 41 dias de idade, alojados em 25 boxes de 2m² e distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em grupos de cinco tratamentos e cinco repetições com 16 aves cada. Esses tratamentos corresponderam a dieta sem antibiótico e sem anticoccidiano (controle negativo); dieta com antibiótico e anticoccidiano (controle positivo); dieta com 0,4% de óleo de aroeira-vermelha; dieta com 200mg de vitamina E kg⁻¹; dieta com 0,4% de óleo de aroeira-vermelha e 200mg de

vitamina E kg⁻¹. Bacitracina de zinco 15% (45mg kg⁻¹) e salinomicina 12% (66mg kg⁻¹) foram o antibiótico e o anticoccidiano utilizados no grupo controle positivo.

O óleo essencial de frutos maduros de aroeira-vermelha (*S. terebinthifolius* Raddi) foi obtido pela técnica de destilação por arraste a vapor (BERTOLDI, 2006). Entre os compostos presentes no óleo essencial de aroeira-vermelha, obtido de frutos maduros, o α -pineno foi o constituinte majoritário (29,39%) seguido pelo δ -careno (19,69%), limoneno (18,15%) e α -felandreno (9,39%).

Ao final do período experimental cinco aves por tratamento foram submetidas a jejum de seis horas, para posterior isolamento de um fragmento do íleo (Divertículo de Meckel até a junção ileocecal), de aproximadamente 15cm de comprimento, separada por ligaduras, removida, acondicionada em sacos de plástico, colocada em caixa térmica contendo gelo e encaminhados ao setor de Microbiologia.

Para cada amostra de íleo foi injetado 10mL de caldo Tioglicolato de Sódio Reduzido seguido de homogeneização e sucção de 1mL do caldo introduzido. Em seguida, foram realizadas diluições decimais das amostras em tubos de ensaio contendo 9mL de Tioglicolato de Sódio. Em seguida, foi coletada uma amostra de 0,1mL dos tubos de ensaio contendo diluições de 10⁻⁶ das amostras e transferida para placas de Petri contendo o meio Agar de Man, Rogosa e Sharp (MRS). Em seguida foram colocadas em jarras de anaerobiose com sistema Anaerobac e incubados em estufa a 37°C por 72 horas.

As amostras isoladas do íleo de frangos de corte e selecionadas como do gênero *Lactobacillus* apresentaram-se Gram-positivas, catalase negativa, com produção de gás a partir da glicose e H₂S negativo (TSI), totalizaram 20 amostras por tratamento. Foram utilizadas como controle positivo amostras de referência de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 9338, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis ATCC 7830.

A seguir, as colônias previamente selecionadas e identificadas como *Lactobacillus* spp. foram submetidas a testes de fermentação de diferentes carboidratos, individualmente, com a identificação da espécie pelo sistema API®50CH. O API®50CH é um sistema padronizado que associa 50 testes bioquímicos (controle mais 49 carboidratos) para o estudo da fermentação de açúcares da galeria API®50CH, que é utilizado em conjunto com meio de cultura API®50CHL. Usando uma pipeta estéril, a suspensão bacteriana presente no meio de cultura API®50CHL foi homogeneizada e distribuída em cada um dos 50 microtubos da galeria API50CH (numerados de 0 a 49),

que contêm os respectivos substratos para o estudo do perfil fermentativo da cultura. Todos os microtubos foram recobertos com óleo de parafina estéril para fins de anaerobiose e incubados a 37°C. Todas as cepas de referência e as amostras isoladas de aves foram semeadas no meio API50®CHL (API®systems, bioMérieux). Durante o período de incubação, a fermentação, traduz-se por uma alteração de cor no tubo, devido a uma produção de ácido em anaerobiose revelada pelo indicador de pH do meio. De acordo com os dados referentes à fermentação de cada carboidrato, foi realizada a interpretação através de um software API-WEB, bioMérieux® Analytical products, no qual foi obtido o percentual de identificação.

Considerando-se a análise morfológica e bioquímica dos isolados comparou-se com a caracterização molecular utilizando-se iniciadores específicos descrito por SONG et al. (2000) para a técnica da reação em cadeia da polimerase - PCR. A identificação da espécie foi realizada por PCR multiplex em duas etapas, de acordo com o método descrito por SONG et al. (2000).

Foram também utilizados controles positivos (DNA extraído das amostras de referência) e negativos (reação contendo todos os componentes da PCR, exceto DNA bacteriano) para controle de amplicons.

Os produtos da PCR (12µL) foram acrescidos com solução tampão de corrida e submetidos à eletroforese (50V/ 80minutos) em gel de agarose a 1,7% corado com 5 µL de brometo de etídio (100ng µL⁻¹) juntamente com o marcador de pesos moleculares padrão (50pb DNA Ladder. Invitrogen Corporation). Posteriormente visualizados em transiluminador com ultravioleta (UV) e fotografados através do sistema de fotodocumentação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base em resultados da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) verificou-se que o grupo controle negativo teve a menor contagem de bactérias do gênero *Lactobacillus*, em um total de 2,7Log₁₀ de UFC mL⁻¹ em contraste com os demais grupos que apresentaram maior contagem (P<0,05) variando entre 5,5 a 6,7Log₁₀ de UFC mL⁻¹ para os tratados com óleo de aroeira-vermelha e de 7,5Log₁₀ de UFC mL⁻¹ para o grupo com promotor de crescimento, que não diferiram significativamente entre si. Esses resultados poderiam ter sido influenciados pela pressão seletiva que o promotor de crescimento e o óleo de aroeira exerceram sobre a microbiota normal, especialmente para os extratos de aroeira que indicaram inibição sobre Gram negativos (MARTINEZ et al., 1996).

Para a identificação das espécies de *Lactobacillus* spp. foram utilizadas somente as amostras consideradas compatíveis com esse gênero que tiveram resultados positivos no teste de coloração de Gram e na produção de gás em glicose e resultados negativos no teste de catalase e na produção de H₂S em TSI. Portanto, após a caracterização fenotípica do gênero *Lactobacillus*, foram identificadas, em ambas as metodologias, 100 amostras de *Lactobacillus* spp. sendo 20 amostras por tratamento.

Por meio dos testes bioquímicos identificaram-se quatro diferentes espécies isoladas do íleo que foram classificadas como *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* além de *Lactococcus Lactis* spp. *lactis* (Tabela 1). As aves alimentadas sem promotor de crescimento ou com óleo de aroeira-vermelha tiveram maior ocorrência de *Lactobacillus* do grupo *L. acidophilus* (Tabela 2), que indica uma diversidade de espécies, sendo importante ressaltar que os tratados com óleo de aroeira também tiveram maior contagem de bactérias do gênero *Lactobacillus* comparado com o controle negativo (P<0,05). LU et al. (2003) isolaram as espécies *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius* e *L. gasseri* em frangos de corte alimentados com dieta isenta de promotor de crescimento. Entretanto, de acordo com KNARREBORG et al. (2002) os promotores de crescimento podem selecionar a microbiota do íleo de frangos de corte. No presente estudo, a espécie *L. acidophilus* foi predominante no grupo tratado com promotor de crescimento que sugere a influência dos tratamentos sobre a microbiota intestinal.

Para as amostras padrão ATCC, também foi utilizado o API® 50CHL, que suscitou dúvidas em relação aos resultados, uma vez que houve discordância entre as amostras de referência *L. acidophilus* ATCC 314 e *L. fermentum* ATCC 9338 que foram identificadas como *L. paracasei* spp. *paracasei* com 99,7 e 98,9% de confiabilidade, respectivamente e a de *L. delbrueckii* ATCC 7830 que foi identificado como *Lactococcus lactis* spp. *lactis* com 94,8% de confiabilidade. Apenas a amostra de *L. acidophilus* ATCC 4356 foi identificada como *L. acidophilus* como 80,7% de confiabilidade pelo API®50CHL.

A utilização do padrão de fermentação de carboidratos como único critério para identificação de bactérias ácido-láticas é insatisfatória, pois ocorrem frequentemente variações nas fermentações e interpretação subjetiva (DE MARTINIS, 2002).

Tabela 1 - Identificação fenotípica e molecular das amostras de referência de bactérias do gênero *Lactobacillus* realizada pelo API 50CHL (bioMérieux S.A., França) e o grau de certeza da sua identificação, em percentagem.

Amostras ATCC	Caracterização bioquímica	Caracterização molecular	Percentual identificação
<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	80,7%
<i>L.acidophilus</i> ATCC 314	<i>L.paracasei</i> spp. paracasei	<i>L. acidophilus</i>	99,7%
<i>L.fermentum</i> ATCC 9338	<i>L. paracasei</i> spp. paracasei	<i>L. fermentum</i>	98,9%
<i>L. delbrueckii</i> spp. lactis ATCC 7830	<i>L lactis</i> spp. lactis	Ausência de amplicons	94,8%

Por outro lado as metodologias moleculares baseadas na PCR (*Polimerase Chain Reaction*) constituem uma ferramenta de identificação bacteriana principalmente devido à rapidez na obtenção de resposta e elevada sensibilidade e especificidade (SANDHU et al., 1997; GOLDANI & SUGAR, 1998; MOTOYAMA et al., 2000; BIALEK et al., 2000). Nestes procedimentos são amplificados fragmentos de DNA das bactérias utilizando oligonucleotídeos específicos, como *primers*, os quais são separados electroforéticamente em função do tamanho, permitindo identificar as diferentes espécies (MORACE et al., 1997).

Nesta pesquisa, os *primers* (iniciadores) utilizados para identificação foram espécie-específicos, com base nas sequências do gene 16S e 23S, além da sequência contida no espaço intragênico 16S-23S, descritos por SONG et al. (2000). Os resultados da

identificação molecular das amostras de bactérias ácido-láticas isoladas do íleo de frangos de corte (AIA) e das amostras ATCC encontram-se na tabela 2 e ilustrados na figura 1. Os resultados apresentados mostraram que as amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de aves e as amostras padrão ATCC que amplificaram ambos os iniciadores (LU-1'/Lac-2) e (Lac-1 / 23-10C) correspondem à *L. acidophilus*. Contudo, aquelas que amplificaram apenas com o iniciador (LU-1'/Lac-2) tratam-se das demais espécies que compõe o grupo *L. acidophilus*. Já as amostras que amplificaram um fragmento de 192pb com o iniciador (Fer 3/Fer 4), correspondem ao padrão para *L. fermentum*, visualizado na figura 1. Como o método de identificação taxonômica por PCR multiplex foi desenvolvido para amostras intestinais, o conjunto de iniciadores utilizados mostrou-se suficiente para a identificação das espécies de *Lactobacillus* spp.

Tabela 2 - Identificação fenotípica e molecular de amostras de bactérias do gênero *Lactobacillus* isoladas de íleo de frangos de corte realizada pelo API 50CHL (bioMérieux S.A., França) e o grau de certeza da sua identificação, em percentagem

Tratamentos	Caracterização bioquímica	Caracterização molecular	Percentual identificação
Controle negativo ¹	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L. acidophilus</i>	96,7%
Controle negativo ¹	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	96,6%
Controle negativo ¹	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L. acidophilus</i>	90,9%
Controle positivo ²	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Ausência de amplicons	54,0%
Controle positivo ²	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	99,5%
0,4% OAV	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L. acidophilus</i>	90,4%
200mg vit E	<i>L. delbrueckii</i> spp. delbrueckii	Ausência de amplicons	99,9%
200mg vit E	<i>L. delbrueckii</i> spp. delbrueckii	Ausência de amplicons	92,8%
200mg vit E	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L. acidophilus</i>	90,2%
200mg vit E	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L. acidophilus</i>	80,0%
200mg vit E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ausência de amplicons	87,9%
200mg vitE + 0,4%OAV	<i>L. delbrueckii</i> spp. delbrueckii	Ausência de amplicons	91,7%
200mg vitE + 0,4% OAV	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L. acidophilus</i>	95,0%
200mg vitE + 0,4% OAV	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L.acidophilus</i>	93,8%
200mg vitE +0,4% OAV	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	Grupo <i>L. acidophilus</i>	94,9%

Controle negativo: dieta sem antibiótico e sem anticoccidiano

Controle Positivo: dieta com antibiótico e anticoccidiano

OAV: oleo de aroeira vermelha

As amostras que foram identificadas bioquimicamente pelo API® 50CHL como *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (ATCC) e *Lactococcus lactis* spp. *lactis* não apresentaram fragmentos amplificados que denota ausência das sequências de DNA, alvo ilustrando que a identificação das amostras de *Lactobacillus* spp. foram espécie-específicos.

A concordância entre a identificação taxonômica realizada pela técnica do PCR multiplex e o perfil bioquímico pelo API foi baixa, num total de 30 amostras, incluindo as espécies de *Lactobacillus* isoladas do íleo e as estirpes de referência ATCC. Em geral, as bactérias que tinham sido identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pelo teste fermentativo foram caracterizadas pela PCR como *Lactobacillus* do grupo *L. acidophilus*, com fragmentos amplificados em 300pb. Pelo método bioquímico, as amostras

isoladas de aves identificadas como *L. acidophilus* e *L. fermentum*, quando testadas na PCR para identificação, as mesmas apresentaram resultado positivo. As amostras que tinham sido identificadas bioquimicamente pelo API®50CHL como *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* e *Lactococcus lactis* spp. *lactis* não apresentaram fragmentos amplificados.

CONCLUSÃO

Para as espécies de *Lactobacillus* spp. isoladas do íleo de frangos de corte, a identificação a partir da PCR multiplex apresentou-se mais sensível que o método bioquímico. Entretanto, a caracterização bioquímica é útil como ferramenta de triagem de bactérias ácido-láticas. As aves tratadas sem promotor de crescimento ou com óleo de aroeira-vermelha tiveram maior ocorrência de *Lactobacillus* do grupo *L.*

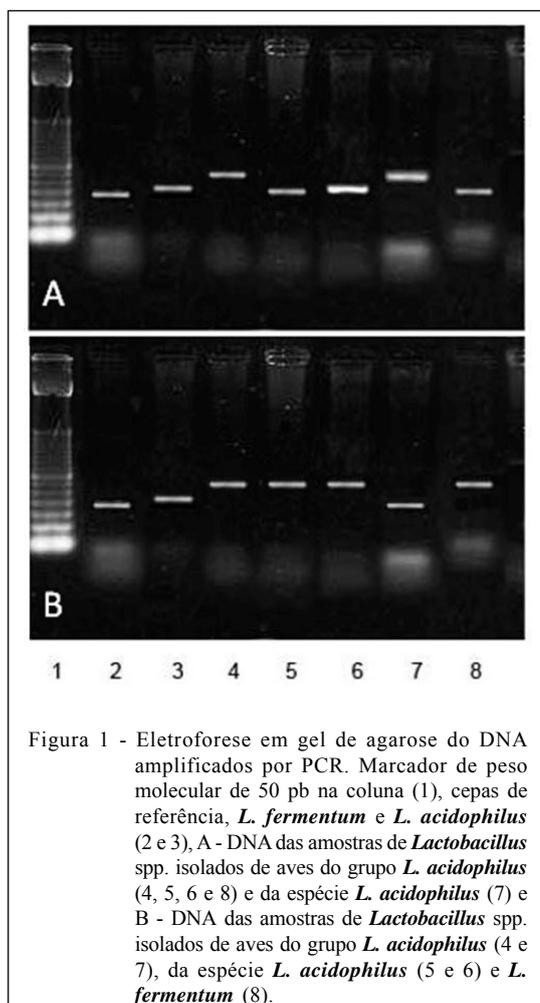


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose do DNA amplificados por PCR. Marcador de peso molecular de 50 pb na coluna (1), cepas de referência, *L. fermentum* e *L. acidophilus* (2 e 3), A - DNA das amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de aves do grupo *L. acidophilus* (4, 5, 6 e 8) e da espécie *L. acidophilus* (7) e B - DNA das amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de aves do grupo *L. acidophilus* (4 e 7), da espécie *L. acidophilus* (5 e 6) e *L. fermentum* (8).

acidophilus. Por outro lado, a espécie *L. acidophilus* foi isolada predominante no grupo tratado com promotor de crescimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido para execução desta pesquisa.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O protocolo de experimentação animal está de acordo com CONEA e foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Espírito Santo pelo protocolo nº 01/08.

REFERÊNCIAS

- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. et al. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p.1-66.
- BARBOSA, D.A et al. Estudo farmacobotânico comparativo de folhas de *Turnera chamaedrifolia* Cambess. e *Turnera subulata* Sm. (*Turneraceae*). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, p.396-413, 2007.
- BARROS, M.R. et al. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.2, p.319-325, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000200006>. Acesso em: 20 nov. 2010. doi: 10.1590/S0102-09352009000200006.
- BERTOLDI, M.C. **Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, MG.
- BIALEK, R. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a Nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.4, n.8, p.2940-2942, 2000.
- De MARTINIS, E.C.P. Identification of meat isolated bacteriocin-producing lactic acid bacteria using biotyping and ribotyping. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.6, p.659-661, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352002000600018>. Acesso em: 21 fev. 2011. doi: 10.1590/S0102-09352002000600018.
- GABRIEL, J.C. et al. Extrato de pomelo (*Citrus maxima*) como aditivo em rações para frangos de corte. **ARS Veterinária**, v.25, n.2, p.084-089, 2009.
- GODOI, M.J.S. et al. Utilização de aditivos em rações formuladas com milho normal e de baixa qualidade para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.1005-1011, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008000600008>. Acesso em: 18 abr. 2011. doi:10.1590/S1516-35982008000600008.
- GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M.. Use of the Polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine Paracoccidioidomycosis. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**. v.58, n.2, p.152-153, 1998.
- HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD-BRIAN, J.B.; HOLZAPFEL, W.H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie, 1995. p.19-54.
- KNARREBORG, A. et al. Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.99, p.131-140, 2002.
- LU, Z. et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.225-235, 2003.
- MARTINEZ, M.J. et al. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol**, v.52, p.171-174, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874196014055>. Acesso em: 13 fev. 2011. doi: 10.1016/0378-8741(96)01405-5.
- MORACE, G. et al. Identification of various medically important *Candida* species by PCR-restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.3, p.667-672, 1997
- MOTOYAMA, A.B. et al. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p.3406-3109, 2000.
- RIBAS, M.O. et al. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**, v.21, n.53, p.245-52, 2006.
- SANDHU, G.S. et al. Molecular detections and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1894-1896, 1997.
- SILVA, M. A. da et al. Óleo de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2151-2156, 2010. Disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/331/33119160012.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2011. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000160.
- SILVA, M. A. da et al. Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. **Ciencia Rural**, v.41, n.4, p.676-681, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n4/a923cr3695.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2011. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011005000034.
- SONG, Y.L. et al. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v.187, n.2, p.167-173, 2000.
- TRAESEL, K.C. et al. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural**,

v.41, n.2, p.278-284, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n2/a867cr3715.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000200016>.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual 2009/2010**. Brasília. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiababef.php?notcodigo=2264>>. Acesso em: 07 set 2011.

VANDEPLAS, S. **Attempt to develop treatments based on bacteriaenzyme combination to reduce broiler contamination by two main human bacterial food-born enteric pathogens**. 2010. 201f. PhD (Dissertation) - Gembloux, Belgium, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège.

WAHYUNINGSIH, R. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. **Journal of Clin. Microbiology**, v.38, n.8, p.3016-3021, 2000.