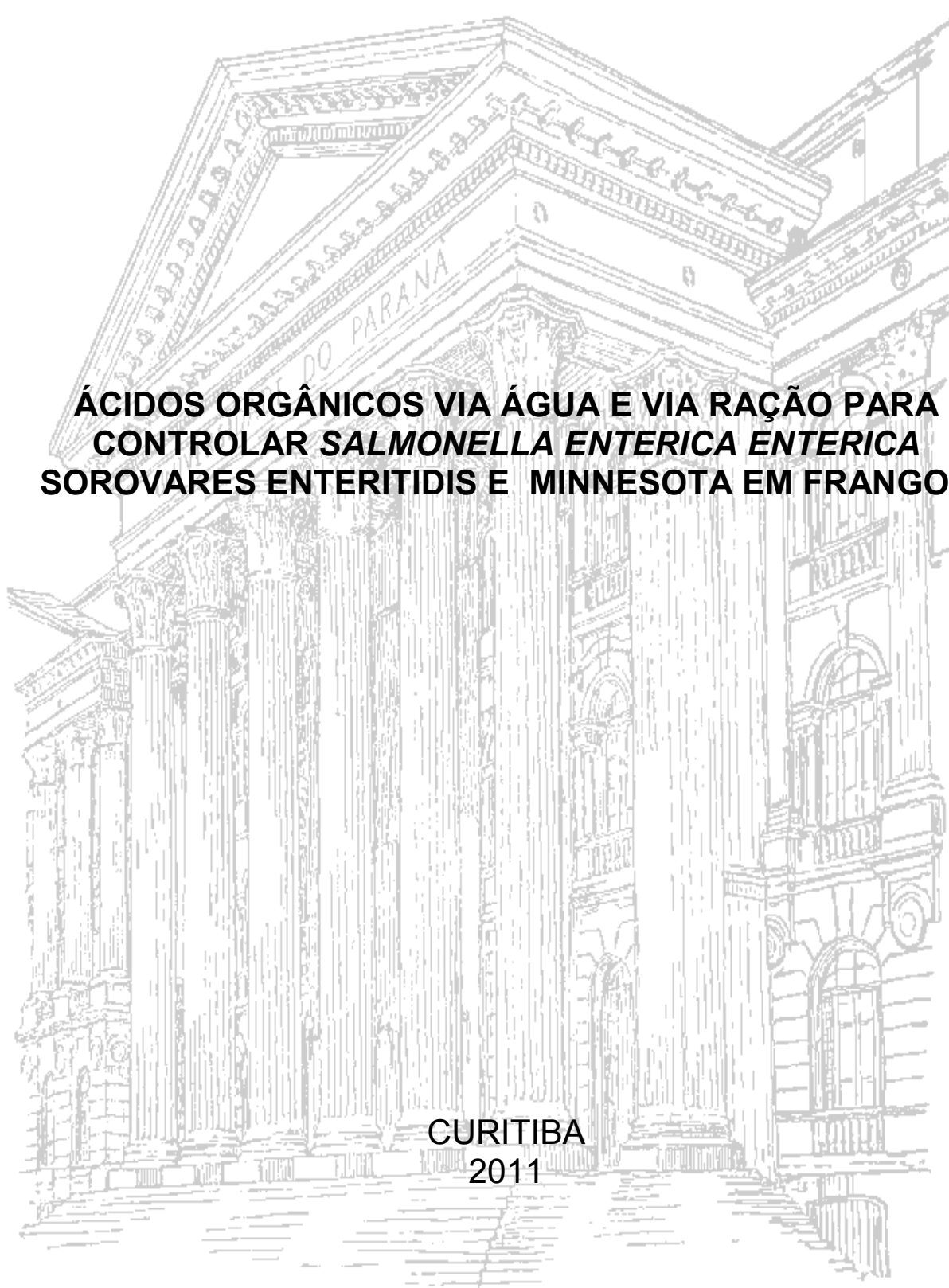


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

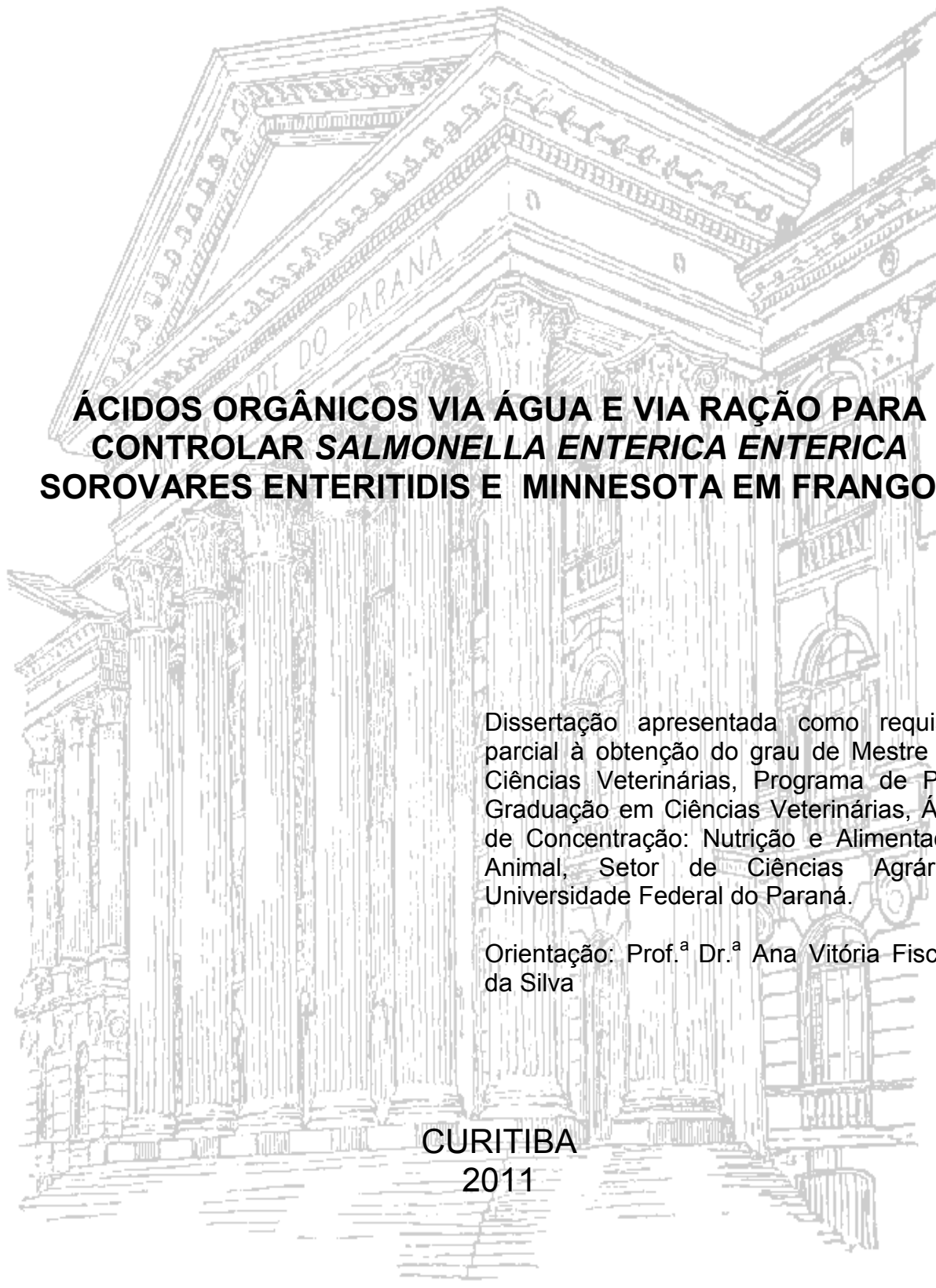
LARISSA PICKLER



**ÁCIDOS ORGÂNICOS VIA ÁGUA E VIA RAÇÃO PARA  
CONTROLAR *SALMONELLA ENTERICA ENTERICA*  
SOROVARES ENTERITIDIS E MINNESOTA EM FRANGOS**

CURITIBA  
2011

LARISSA PICKLER



**ÁCIDOS ORGÂNICOS VIA ÁGUA E VIA RAÇÃO PARA  
CONTROLAR *SALMONELLA ENTERICA ENTERICA*  
SOROVARES ENTERITIDIS E MINNESOTA EM FRANGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Vitória Fischer da Silva

CURITIBA  
2011

P597 Pickler, Larissa

Ácidos orgânicos via água e via ração para controlar  
*Salmonella enterica enterica* sorovares Enteritidis e Minnessota  
em frangos / Larissa Pickler. – Curitiba, 2011.

64f. : il. (algumas color.) ; 23 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2011

Orientador: Ana Vitória Fischer da Silva

1. Salmonela. 2. Frango de corte – Alimentação e rações.  
I. Silva, Ana Vitória Fischer da. II. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. III. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU 636.5

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho a minha família, em especial meus pais, Airton e Mirtes, minhas irmãs Juliana e Vanessa, e ao meu namorado Marcelo que me deram forças nos momentos difíceis e não me deixaram desistir frente aos obstáculos. Um agradecimento especial a toda equipe da Sanex Ind. e Com. Pelo apoio financeiro. Dedico também a todos os amigos do Laboratório de Ornitopatologia pois sem eles não seria possível a realização deste e de outros trabalhos. E um especial agradecimento as minhas orientadoras Dra. Ana Vitória F. da Silva e Dra. Elizabeth Santin por dividirem comigo seus conhecimentos e por todas as oportunidades de crescimento pessoal, intelectual e profissional. Obrigada!*

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**ÁCIDOS ORGÂNICOS VIA ÁGUA E VIA RAÇÃO PARA CONTROLAR *Salmonella enterica enterica* SOROVARES ENTERITIDIS E MINNESOTA EM FRANGOS**” apresentada pela Mestranda LARISSA PICKLER declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 21 de fevereiro de 2011

  
Professora Dra. Ana Vitória Fischer da Silva  
Presidente/Orientadora

  
Professora Dra. Elizabeth Santin  
Membro

  
Dr. Alberto Back  
Membro

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO .....	X
ABSTRACT .....	XI
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS.....	13
<b>CAPÍTULO 1 - ÁCIDOS ORGÂNICOS COMO FERRAMENTA PARA EQUILIBRAR A MICROBIOTA GASTROINTESTINAL DE FRANGOS .....</b>	<b>14</b>
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
INTRODUÇÃO .....	17
MICROBIOTA INTESTINAL.....	18
SALMONELOSE EM FRANGOS .....	18
ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	23
CONCLUSÕES .....	29
REFERÊNCIAS.....	29
<b>CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, HISTOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>SALMONELLA ENTERICA ENTERICA</i> SOROVARES ENTERITIDIS E MINNESOTA E TRATADOS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS.....</b>	<b>33</b>
RESUMO .....	34
ABSTRACT .....	35
INTRODUÇÃO .....	36

<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<b>EXPERIMENTO 1</b> .....	<b>38</b>
ANIMAIS, DIETAS E AMBIENTE .....	38
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO .....	38
CEPA E INOCULAÇÃO.....	39
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	40
NECROPSIA .....	40
HISTOPATOLOGIA E MORFOLOGIA INTESTINAL .....	41
IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	42
CITOMETRIA DE FLUXO DE FLUXO .....	42
<b>EXPERIMENTO 2</b> .....	<b>44</b>
ANIMAIS, DIETA E AMBIENTE .....	44
CEPA E INOCULAÇÃO .....	45
COLETA DE AMOSTRAS PARA MICROBIOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	45
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>EXPERIMENTO 1</b> .....	<b>46</b>
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO .....	46
ANÁLISE DE <i>SALMONELLA</i> .....	47
MORFOLOGIA INTESTINAL E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	48
CITOMETRIA DE FLUXO .....	49
<b>EXPERIMENTO 2</b> .....	<b>50</b>
ANÁLISE DE <i>SALMONELLA</i> .....	50
MORFOLOGIA INTESTINAL E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	51
COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS NOS EXPERIMENTOS 1 E 2 .....	53
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1 – Quantidade pH e principais microorganismos em papo, proventrículo, moela, duodeno, jejuno, íleo e ceco de frangos .....	20
Tabela 2 – Lista de ácidos orgânicos e suas propriedades.....	23

### Capítulo 2

Tabela 1 - Média e Desvio Padrão do Consumo de ração Médio (CRM), Ganho de Peso Total (GPT), Ganho de peso Médio (GPM) e Conversão Alimentar (CA) de 1-21 dias de idade nos diferentes tratamentos.....	44
Tabela 2 – Média e desvio padrão da Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE), Log10 UFC, em suabe de cloaca (48h pós-inoculação com SE). Número de amostras positivas em relação ao total de amostras para SE em ceco e papo de frangos de corte 7 dias pós-inoculação com SE, nos diferentes tratamentos.....	45
Tabela 3 – Média e Desvio Padrão da altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de criptas ( $\mu\text{m}$ ), relação vilo/cripta, contagem de células caliciformes, contagem de células CD3+/campo em duodeno, jejuno, íleo e ceco (21 dias de idade e 7 dias pós-inoculação com <i>Salmonella</i> Enteritidis nos diferentes tratamentos.....	47
Tabela 4 – Média e Desvio Padrão das proporções de células circulantes no sangue de frangos de corte aos 21 dias de idade após 7 dias de inoculação com SE, de acordo com a subpopulação identificada (ou razão entre as populações CD4+ e CD8+) .....	48
Tabela 5 – Média e Desvio Padrão da Contagem de <i>Salmonella</i> Minnesota (SM), Log10 UFC, em suabe de cloaca (48h pós-inoculação com SM) papo e ceco de frangos de corte (7 dias pós inoculação com SM).....	49
Tabela 6 – Média e Desvio Padrão da altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de criptas ( $\mu\text{m}$ ), relação vilo/cripta, contagem de células caliciformes, contagem de células CD3+/campo em duodeno, jejuno, íleo e ceco (28 dias de idade e 7 dias pós-inoculação com <i>Salmonella</i> Minnesota nos diferentes tratamentos.....	50



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

Figura 1 - Porcentagem (%) de redução de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e <i>Salmonella</i> Minnesota (SM) em relação ao grupos controle inoculados em papo e ceco de frangos 7 dias após inoculação nos diferentes tratamentos.....	20
--	----

## RESUMO

A Salmonelose é um dos maiores problemas na avicultura industrial, principalmente por seus impactos em Saúde Pública. Esta bactéria é responsável por causar toxinfecções alimentares em seres humanos relacionadas ao consumo de carne de frango e ovos contaminados o que explica o grande interesse pelo estudo desta doença. A *Salmonella enterica subespécie enterica* sorovar Enteritidis ocupa um destacado lugar por causar mortalidade em aves jovens e, sobretudo por ser uma das salmonelas paratíficas mais patogênicas para o homem. Uma vez presente no lote, torna-se muito difícil erradicá-la, pois a ave contaminada permanece eliminando a bactéria pelo resto da vida e assim disseminando-a pelo ambiente. O intenso controle frente aos sorovares Enteritidis e Typhimurium acabaram por ocasionar o aparecimento de outros sorovares, como por exemplo o Minnesota. Existem várias maneiras para o controle das salmonelas paratíficas, entre elas a adição de ácidos orgânicos na ração ou mesmo na água de bebida das aves para reduzir a contaminação das carcaças. Porém, ainda não existem estudos que possam comprovar a eficiência dos usuais métodos de controle de salmonelas, frente a estes outros sorotipos, como o Minnesota, o que requer maiores estudos com relação a capacidade e mecanismo de ação dos ácidos frente aos diferentes patógenos gastrointestinais. Frente a isto, esta dissertação foi dividida em dois capítulos: Capítulo I uma revisão sobre “Ácidos orgânicos como ferramenta para Equilibrar a Microbiota Gastrointestinal de frangos” e o capítulo II um trabalho científico intitulado “Avaliação microbiológica, histopatológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica enterica* sorovares Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos”.

**Palavras-Chave:** células caliciformes, células CD3+, citometria de fluxo.

## ABSTRACT

Salmonellosis is the major problem in poultry industry, specially for the impact in Public Health, where is responsible for toxiinfections in humans bean related to the consumption of contaminated chicken meat and eggs, which explains the interest in study this disease. *Salmonella enterica subesp. enterica* serovar Enteritidis has a important role to cause mortality in young chickens and especially for being one of the most pathogenic *Salmonella* paratyphoid for humans. Once present in the livestock, is very difficult to eradicate, because the chickens remains contaminated and eliminate the bacteria for all life spreading by the enviroment. The intensive control of Typhimurium and Enteritidis serovars eventually lead to the emergence of others serovars, such as Minnesota. There are several ways to control *Salmonella* paratyphoid, as the addition of organic acids in the diet or in drinking water of chickens to reduce contamination. However, there no studies to prove the efficiency of the usual methods to control *Salmonella* in front of these other serotypes, such as Minnesota, which requires further studies regarding the ability and mechanism of action of organic acids front a different gastrointestinal pathogens. In front of this problem, this thesis was divided in two chapters: Chapter I - A review about “Organic Acids to Balance the Gut Microflora in broilers” and Chapter II a scientific study about “Microbiological, Histopatological and Imunnological evaluation of Broiler Chickens challenged with *Salmonella enterica enterica* sorovars Enteritidis and Minnesota and treated with Organic Acids”.

**Key-words:** CD3+ cells, flow citometric, goblet cells.

## INTRODUÇÃO GERAL

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies de bactérias, formando um sistema complexo e dinâmico responsável por influenciar fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (Tannock, 1998). Ela tem importantes funções no trato gastrointestinal (TGI), tais como a criação de um ambiente ácido e com baixos teores de oxigênio, dificultando a sobrevivência de outras bactérias, e de impedir a aderência de bactérias patogênicas formando uma estrutura filamentosa ao longo do intestino (Macari, 2001).

Qualquer fator que leve ao desequilíbrio da microbiota intestinal, como o uso indevido de antimicrobianos, estresse, mudanças bruscas na alimentação, fatores imunossupressores, poderá permitir a instalação e a multiplicação de microrganismos patogênicos. Assim, é evidente que o equilíbrio da microbiota intestinal reflete diretamente em um bom estado de saúde do hospedeiro (Miles, 1993).

Lactobacilos, Bacterióides, Bifidobactérias, Estreptococos entre outros microorganismos fazem parte da microbiota intestinal das aves. Porém desequilíbrios nesta microbiota podem favorecer o aparecimento de bactérias patogênicas como, por exemplo, as do gênero *Salmonella*, e estas, por sua vez, podem trazer prejuízos para a saúde animal.

O termo “salmonelose” é usado para indicar a infecção causada por bactérias do gênero *Salmonella* da família *Enterobacteriaceae*. A *Salmonella* é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos e devido diferenças bioquímicas subdivide-se em 2 espécies ; *S. bongori* e *S. enterica* sendo que a última divide-se em seis subespécies ; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* com mais

de 2500 sorotipos (Back e Ishizuka, 2010; McClelland et al, 2004; Bopp et al., 2003). Somente cerca de 10% destes sorovares já foram isolados de aves e apenas uma pequena parcela é comum em granjas de frangos de corte. Sorovares prevalentes em seres humanos como Typhimurium e Enteritidis também são comuns em frangos de corte (Gast, 2007).

De acordo com o quadro clínico a salmonelose podem ser classificadas em pulorose, causada pela *Salmonella* Pulorum; tifo, causado pela *Salmonella* Gallinarum e o paratifo aviário causado pelos demais sorotipos entre eles *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Minnesota. O paratifo geralmente não causa comprometimento nos lotes de frangos de corte, mas a sua importância está na saúde pública devido a associação com quadros de toxinfecção alimentar em seres humanos (Back e Ishizuka, 2010).

Dentre as salmonelas, o sorovar Enteritidis ocupa um destacado lugar por causar mortalidade em aves jovens e, sobretudo por ser uma das salmonelas paratíficas mais patogênicas para o homem, sua ocorrência se dá principalmente pelo consumo de carne e ovos contaminados. Uma vez presente no lote, torna-se muito difícil erradicá-la, pois a ave contaminada permanece eliminando a bactéria pelo resto da vida e assim disseminando-a pelo ambiente.

Existem indícios de que o intenso controle na produção avícola frente aos sorovares Enteritidis e Typhimurium acabaram por ocasionar o aparecimento de outros sorotipos, como por exemplo o Minnesota, pelo mecanismo de exclusão competitiva. E, por outro lado, ainda não existem estudos conclusivos que comprovem a eficiência de ácidos orgânicos frente a todos os sorotipos de salmonela.

Os ácidos orgânicos associados com atividade antimicrobiana são os ácidos graxos de cadeia curta, tanto monocarboxílicos, como fórmico, acético, propiônico e o butírico ou carboxilados com o grupo hidroxila como láctico, málico, tartárico e o cítrico (Dibner e Butin, 2002). Acredita-se que os ácidos orgânicos exercem atividade antimicrobiana devido a redução do pH no interior da célula microbiana (Cherrington et al. 1991; Roth, 1998). No interior da célula o ácido se dissocia alterando o pH citoplasmático, afetando o metabolismo e levando a morte da célula bacteriana (Gauthier, 2005; Russel, 1992). Recentemente Stratford et al (2009) demonstraram que nem todos os ácidos necessitam reduzir o pH no citoplasma para exercer sua atividade antimicrobiana. Por exemplo, no caso do ácido sórbico, observa-se que concentrações inibitórias deste ácido não reduzem o pH citoplasmático e acredita-se que a membrana citoplasmática seja o primeiro sítio de ação deste ácido. A lesão da membrana, a perda da sua integridade e o aumento a permeabilidade a prótons, levam a morte do microorganismo.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo é abordar por meio de uma revisão bibliográfica a importância do equilíbrio da microbiota intestinal e como ácidos orgânicos podem atuar no desenvolvimento da microbiota intestinal e no controle de bactérias patogênicas. Um segundo objetivo é avaliar por meio de dois experimentos o uso de ácidos orgânicos via ração ou água de bebida em frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica enterica* sorovares Enteritidis e Minnesota, investigando o controle destas bactérias por meio de análises microbiológicas, histopatológicas e imunológicas.

Ambos os capítulos foram elaborados nas normas para publicação na revista *Archives of Veterinary Science*, da Universidade Federal do Paraná.

## REFERÊNCIAS

- BACK, A.; ISHIZUKA, M. M. Principais Doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde. In: **Salmonelose aviária**. 1ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2010, p.120-189.
- BOPP, C.A.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALTER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM press, 2003. Cap.28, p.459–474.
- CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Organic Acids: Chemistry antibacterial activity and practical application. **Advances in Microbiological Physiology**, v. 32, p.87-108, 1991.
- DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied and Poultry Research**, n. 11, p. 453-463, 2002.
- GAST, R.; GURAYA, R.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S.; MOORE, P.S. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease**. P. 40-44, 2007.
- GAUTHIER, R. Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoters in poultry. 2005. URL <<http://www.jifo.ca/pdf/avicola/AnaisAveExpo-R.Gauthier.pdf>>. Acesso em 27 de dezembro de 2010.
- MACARI, M.A.; MAIORKA, A. Aspectos Fisiológicos da Qualidade Intestinal e Produtividade em Frangos de Corte. Departamento de Morfofisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias & Veterinárias, Campus Jaboticabal, 2001.
- MCCLELAND, M.; SANDERSON, K.E.; CLIFON, S.W. Comparison of degradation in Paratyphi and Thyphy, human restricted serovars of *Salmonella* enteric that cause typhoid. **Nature Genetics**, p.1-7, 2004.
- MILES, R.O. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. 111: Alltech Biotechnology in the Feed and Oustry, **Proceedings**. p.133- 50, 1993.
- STRATFORD, M.; PLUMRIDGE, A.; NEBE-VON-CARON, G.; ARCHER, D.B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 37-43, 2009.
- TANNOCK, O.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, v.8, p.527-33, 1998.
- ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Organic acids as feed additives for young pigs: nutritional and gastrointestinal effects. **Journal of Animal and Feed Science**, n. 8, p. 25-33, 1998.
- RUSSEL, J. B. Another Explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.363-370, 1992.

## **CAPÍTULO 1**

# **ÁCIDOS ORGÂNICOS COMO FERRAMENTA PARA EQUILIBRAR A MICROBIOTA GASTROINTESTINAL DE FRANGOS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



**ÁCIDOS ORGÂNICOS COMO FERRAMENTA PARA EQUILIBRAR A  
MICROBIOTA GASTROINTESTINAL DE FRANGOS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**  
*(Organic Acids to Balance the Gut Microflora in broilers – Review)*

**RESUMO**

Uma série de aditivos alimentares, incluindo antibióticos, tem sido amplamente utilizados na indústria avícola durante vários anos. A manipulação das funções gastrointestinais e da microbiota dos animais domésticos com aditivos alimentares é reconhecida como uma importante ferramenta para melhorar o desempenho e a eficiência alimentar. Recentemente, as preocupações com os possíveis resíduos de antibióticos e microorganismos resistentes tem despertado restrições no uso de antibióticos na indústria animal. A proibição do uso de antibióticos como aditivos na alimentação animal pela União Europeia, tem acelerado as investigações sobre melhoradores de desempenho alternativos. Neste aspecto, ácidos orgânicos já são utilizados na alimentação animal para melhorar o desempenho e para controlar a população de microorganismos patogênicos no intestino em sistemas de manejo intensivo. O objetivo desta revisão é abordar a importância do equilíbrio da microbiota intestinal e como ácidos orgânicos podem atuar no desenvolvimento da microbiota intestinal, no controle de bactérias patogênicas e no desempenho zootécnico dos animais.

**Palavras-chave:** aditivos, controle microbiológico, desempenho, morfologia intestinal.

**ABSTRACT**

A number of feed additives including antibiotics have been widely used in the poultry industry for several years. The manipulation of gut functions and microflora of domestic animals with feed additives has been recognized as an important tool for improving growth performance and feed efficiency. Recently, the concerns about possible antibiotic residues and microorganisms resistant have aroused great caution in the use of antibiotics in the animal industry. The ban on the use of antibiotics as feed additives for the European Union has accelerated and led to investigations of alternative feed. As alternatives, organic acids are already used as feed supplements to improve growth performance and to control the pathogen population in gut under intensive management systems. The aim of this review is discuss about the importance of the balance of intestinal microflora and how organic acid could interfere on development of intestinal microflora, in control of pathogenic bacteria and animal performance.

**Key-words:** additives, microbiological control, performance, intestinal morphology.

## INTRODUÇÃO

O uso de antibióticos como promotores de crescimento na avicultura comercial tornou-se uma prática rotineira devido às vantagens que podem trazer com relação aos índices de desempenho zootécnico dos animais, melhorando a eficiência econômica do sistema de produção. Os efeitos dos antibióticos são obtidos por interferência na síntese da parede celular, alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, interferências na replicação cromossômica e na síntese protéica bacteriana (Utiyama et al, 2006). Os mecanismos de promoção de crescimento relacionados com o uso de antibióticos estão focados, principalmente, na interação destes aditivos com a microbiota intestinal. Eles reduzem a competição por nutrientes entre a microbiota e o animal e a produção de metabólitos microbianos de patógenos (Anderson et al, 1999).

Apesar dos conhecimentos benéficos associados à produção animal, o uso de antibióticos como promotores de crescimento sempre foi contestado devido a provável ocorrência de resistência bacteriana. Os consumidores de carne de frango têm forçado modificações, proibindo a utilização de antibióticos como aditivos alimentares na produção animal. Na União Européia, aditivos zootécnicos como virginamicina, bacitricina de zinco, espiramicina e tilosina são proibidos devido à preocupação sobre a transferência de resistência a antibióticos ao consumidor. No Brasil estas substâncias são permitidas e autorizadas a serem adicionadas nas rações animais. A principal consequência desta proibição na Europa foi o aumento de diarreias e do uso de antibióticos com fins terapêuticos (Grave et al, 2004).

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) beneficia o animal hospedeiro com proteção prevenindo a colonização de bactérias patogênicas por meio de exclusão competitiva. Outro benefício é o desenvolvimento de defesas intestinais como o

muco, a camada epitelial e a lâmina própria. Além da produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e aminoácidos. Os ácidos graxos de cadeia curta fornecem energia e auxiliam o controle de microorganismos não desejados, estimulam a proliferação de células epiteliais e o tamanho das vilosidades aumentando a superfície de absorção (Hart et al. 2002; Dibner e Richards, 2005).

O principal desafio da produção avícola hoje se refere à busca de um equilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro. Esse equilíbrio baseia-se na presença de microorganismos benéficos ao animal e que não façam competição com o hospedeiro por nutrientes ou estejam envolvidos em toxiinfecção em seres humanos. Nessa linha, alguns princípios ativos podem auxiliar neste controle como é o caso dos ácidos orgânicos. Estes são relatados como melhoradores de desempenho zootécnico das aves e moduladores da microbiota intestinal.

Frente a isso, o objetivo desta revisão é abordar a importância do equilíbrio da microbiota intestinal e como ácidos orgânicos podem atuar no desenvolvimento da microbiota intestinal, no controle de bactérias patogênicas e no desempenho dos animais.

### **Microbiota intestinal**

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies de bactérias, como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Coliformes, formando um sistema complexo e dinâmico responsável por influenciar fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (Tannock, 1998). Ela tem importantes funções no TGI, tais como a criação de um ambiente ácido e com baixos teores de oxigênio, dificultando a sobrevivência de outras bactérias, e de impedir a aderência de bactérias patogênicas formando uma estrutura filamentosa ao longo do intestino (Macari, 2001).

Qualquer fator que leve ao desequilíbrio da microbiota intestinal, como o uso indevido de antimicrobianos, estresse, mudanças bruscas na alimentação, fatores imunossupressores, poderá permitir a instalação e a multiplicação de microrganismos patogênicos. Assim, é evidente que o equilíbrio da microbiota intestinal reflete diretamente em um bom estado de saúde do hospedeiro (Miles, 1993).

O número e a composição dos microorganismos variam consideravelmente ao longo do TGI. A população bacteriana no TGI pode ser influenciada por vários fatores como composição da dieta, idade e condições ambientais onde vive o animal e até mesmo a genética. Além disso, somente cerca de 10-60% das bactérias existentes no TGI podem ser cultivadas pelos usuais métodos em laboratório, tornando difícil a caracterização bioquímica e genética da microbiota (Zhu et al, 2002). Recentemente, o desenvolvimento de técnicas moleculares (como por exemplo, Reação em Cadeia da Polimerase - PCR) começaram a ser utilizadas tornando possível a descoberta de outras espécies que participam da microbiota no TGI (Nava et al, 2009).

A tabela 1 apresenta o pH, os principais microorganismos e a quantidade destes nos diferentes segmentos do TGI.

No papo ou inglúvio existe a predominância de *Lactobacillus*, que produzindo ácido láctico e acético impedem o crescimento de outras bactérias. Nas aves, bactérias patogênicas como *Salmonella*, tem o inglúvio como porta de acesso ao TGI, assim um controle neste local é muito importante para impedir ou diminuir a proliferação de patógenos no TGI. De acordo com Hinton et al. (2000), uma solução de glicose a 7,5% na água de frangos, pode aumentar a população de *Lactobacillus*

e reduzir o pH no inglúvio levando a redução na contagem de *Salmonella* Typhimurium e de Enterobactérias.

Tabela 1 – Quantidade, pH e principais microorganismos em papo, proventrículo, moela, duodeno, jejuno, íleo e ceco de frangos.

Segmento	pH	Quantidade	Principais Espécies
Papo	5,5	$10^3$ a $10^5$	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i>
Proventrículo	2,5	-	-
Moela	3,5	-	-
Duodeno	6,0	$10^3$ a $10^5$	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e Coliformes
Jejuno	6,5 a 7,0	$10^8$ a $10^9$	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i> e Coliformes
Íleo	7,0 a 8,0	$10^8$ a $10^9$	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> e Coliformes
Ceco	7,0	$10^{10}$ a $10^{12}$	<i>Lactobacillus</i> , <i>Eubacterium</i> , Bifidobactérias, Bacteróides, <i>Streptococcus</i> e <i>Clostridium</i> .

Adaptado de Wan der Wielien et al.( 2000)

No proventrículo e moela o pH é extremamente baixo e poucas bactérias são capazes de tolerar este ambiente, como por exemplo *Lactobacillus*. No duodeno, o pH é próximo ao neutro e os principais microorganismos que colonizam este segmento do intestino delgado, bem como o jejuno e íleo são *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e Coliformes (Wan der Wielien et al, 2000) O ceco é reconhecido como o segmento de maior colonização de microorganismos e é onde ocorre a fermentação microbiana, sendo que grande número de bactérias Gram positivas e negativas estão presentes neste local como Bifidobactérias, Bacteróides, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium sp.* e *Lactobacillus sp.* (Wan der Wielien et al. 2000). Outros microorganismos podem estar presentes ao longo do TGI das aves, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Eimeria* e *Clostridium* de forma simbiótica com o hospedeiro ou ainda competindo por alimento, induzindo processos inflamatórios e desta forma prejudicando a saúde e piorando os índices produtivos dos animais.

Estes diferentes microorganismos convivem em constante processo de exclusão competitiva que pode ser definido como a inability de uma população de microorganismos em estabelecer-se no intestino, em razão da presença de outra população bacteriana (Day, 1992). Além dessa competição entre os microorganismos, o estabelecimento da microbiota é influenciado pela inclusão/exclusão imunológica, que refere-se a interação entre os microorganismos e o hospedeiro. A inclusão/exclusão imunológica está relacionada com a produção de IgA pelo hospedeiro que facilita ou dificulta a adesão de bactérias na mucosa intestinal. Quando o microorganismo é benéfico ocorre uma baixa produção de IgA, que se liga ao agente e facilita a adesão deste na mucosa intestinal formando um biofilme que protege contra infecção por outros microorganismos e evita a translocação dessa bactéria através da mucosa do hospedeiro (inclusão imunológica). Por outro lado, microorganismos que causam lesão, estimulam a produção de altos níveis de IgA que inibem o agente e impedem a adesão deste ao hospedeiro (exclusão imunológica). Exclusão/inclusão imunológica previne o movimento de microorganismo através da mucosa pela combinação de aumento da produção de muco e de IgA (Everret et al, 2004).

Estes mecanismos de competição entre os microorganismos e a interação do agente com o hospedeiro promovem o equilíbrio ou desequilíbrio da microbiota gastrointestinal. O desequilíbrio é entendido como a predominância de microorganismos patogênicos com conseqüente redução de microorganismos benéficos como *Lactobacillus*, por exemplo.

### **Salmonelose em frangos**

A Salmonelose é uma enfermidade de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias e se constitui em importante barreira ao comércio

internacional de alimentos devido seu potencial zoonótico. A ampla distribuição de *Salmonella* entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (Butaye et al., 2003). O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende as espécies *S. enterica* e *S. bongori*; a espécie *S. enterica* alberga as linhagens patogênicas distribuídas em seis subespécies e 2.564 sorovares, todas patogênicas ao homem (Bopp et al., 2003) onde incluem-se a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Minnesota (SM). De acordo com o esquema clássico de Kauffman-White, mais de 2500 sorovares estão classificados de acordo com os antígenos flagelares (H), somáticos (O) e capsulares (Vi) (Hirsh, 2003).

Segundo o relatório anual do *Center of Disease Control* (2008) no período de 1996 a 2006 nos Estados Unidos foram diagnosticados 75.058 casos de *S. Typhimurium*; 69.547 casos de *S. Enteritidis* e 340 casos de *S. Minnesota* em seres humanos. A *Salmonella* Enteritidis e a *Salmonella* Typhimurium também são os sorovares mais frequentemente isolados em produtos de origem avícola, porém atualmente outros sorovares estão sendo isolados, dentre eles o Minnesota.

Com relação a colonização de *Salmonella* no TGI das aves, inicialmente ocorre a associação física entre a bactéria e o epitélio (Fuller, 1973) e a ligação das células microbianas por meio de adesinas superficiais (Kelly e Yunson, 2000). Dessa forma o epitélio intestinal é a principal via de entrada dos patógenos onde a *Salmonella* multiplica-se no conteúdo intestinal, migra através da mucosa, invadindo e aderindo no epitélio.

O ceco é conhecido como reservatório de *Salmonella*, porém o íleo representa um importante segmento intestinal a ser estudado por situar-se próximo



ao ceco, sendo também freqüentemente colonizado por este tipo de bactéria. (Thompson e Applegate, 2006). Segundo Berndt et al. (2007) a capacidade dos sorovares de *Salmonella* de entrar na mucosa cecal e a invasão de camadas inferiores afeta tanto o nível quanto a natureza da resposta imune no tecido. A SE possui alta capacidade invasiva e pode facilmente ser encontrada nas células da lâmina própria, aumentando assim o recrutamento de granulócitos, células CD8+ e interleucinas.

É verdade, que devido ao mecanismo de exclusão competitiva alguns sorovares podem ser mais eficientes que outros em seu estabelecimento dentro da microbiota dos animais e que, uma vez estes sendo controlados, outros sorovares começam a ser mais freqüentemente isolados. Por outro lado, ainda não é possível afirmar se os atuais métodos de controle de salmonelose em frangos, como por exemplo o uso de ácidos orgânicos são realmente efetivos contra todos os sorovares identificados.

### **Ácidos Orgânicos**

Os ácidos orgânicos são constituintes naturais de plantas e animais. Alguns podem ser formados através da fermentação microbiana no intestino e outros nas rotas metabólicas intermediárias (Lehninger et al. 1993). Como grupo químico os ácidos orgânicos são considerados como sendo qualquer substância de estrutura geral R-COOH, gerando grupos de compostos relacionados, conhecidos como derivados dos ácidos carboxílicos, como os aminoácidos, ácidos graxos, coenzimas e metabólitos intermediários (Solomon e Fryhle, 2002). Aqueles associados com atividade antimicrobiana são os ácidos graxos de cadeia curta, tanto monocarboxílicos, como fórmico, acético, propiônico e o butírico ou carboxilados com o grupo hidroxila como láctico, málico, tartárico e o cítrico. A tabela 2 mostra o

nome comum, a designação química, a fórmula e o pKa (constante de dissociação) dos ácidos orgânicos comumente usados como acidificantes para frangos.

Tabela 2- Lista de ácidos orgânicos e suas propriedades.

Ácido	Nome Químico	Fórmula	pKa
Fórmico	Ácido fórmico	HCOOH	3,75
Acético	Ácido acético	CH <sub>3</sub> COOH	4,76
Propiônico	Ácido 2-propanóico	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	4,88
Butírico	Ácido butanóico	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	4,82
Lático	Ácido 2-hydroxypropanoico	CH <sub>3</sub> CH(OH)COOH	3,83
Sórbico	Ácido 2,4-hexandienóico	CH <sub>3</sub> CH:CHCH:CHCOOH	4,76
Fumárico	Ácido 2-butenodióico	COOHCH:CHCOOH	3,02
HMB	Ácido 2-hidroxy-4-methylthio butanóico	CH <sub>3</sub> SCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(OH)COOH	3,86
Málico	Ácido hydroxybutanedióico	COOHCH <sub>2</sub> CH(OH)COOH	3,4
Tartárico	Ácido 2,3-Dihydroxy-butanedioico	COOHCH(OH)CH(OH)COOH	2,93
Cítrico	Ácido 2-hidroxy-1,2,3-ropanetricarboxílico	COOHCH <sub>2</sub> C(OH)(COOH)CH <sub>2</sub> COOH	3,13

Adaptado Dibner e Butin (2002)

Os ácidos orgânicos agem diretamente como inibidores do crescimento bacteriano. São utilizados na conservação de grãos e alimentos, sanitização do alimento e aditivo promotor de crescimento em dietas animais. O principal mecanismo de ação dos ácidos refere-se à Teoria dos Ácidos Fracos, exercendo atividade antimicrobiana devido a redução do pH no interior da célula microbiana (Cherrington et al. 1991; Roth, 1998). A forma não dissociada do ácido é lipossolúvel e nessa forma tem capacidade de atravessar de forma passiva a membrana celular. No interior da célula o ácido se dissocia alterando o pH citoplasmático, afetando o metabolismo, alterando o gradiente de prótons e a carga com o exterior, pode também interferir no sistema de transporte de aminoácidos e fosfatos além disso enzimas são inativadas (Russel, 1992). Outra consequência é o aumento da pressão osmótica celular, que desencadeia mecanismos de compensação de carga elétrica aumentando os níveis de sódio, potássio ou glutamato e a força iônica intracelular,

provocando um aumento da pressão mecânica sobre a parede do microorganismo, o que faz com que essa se rompa (Russel, 1992).

Recentemente Stratford et al (2009) contesta que essa teoria seja aplicada a todos os ácidos orgânicos. Em seus estudos os autores discutem a teoria dos ácidos fracos, onde demonstram que nem todos os ácidos necessitam reduzir o pH no citoplasma para exercer sua atividade antimicrobiana. Por exemplo, no caso do ácido sórbico, observa-se que concentrações inibitórias deste ácido não reduzem o pH citoplasmático e acredita-se que a membrana citoplasmática seja o primeiro sítio de ação deste ácido. A lesão da membrana, a perda da sua integridade e o aumento a permeabilidade a prótons, levam a morte do microorganismo.

Independente do mecanismo exato de ação dos ácidos orgânicos sobre os microorganismos, para ser uma alternativa viável ao uso de antibióticos como aditivos alimentares, os ácidos orgânicos devem apresentar resultados similares, sem comprometer a saúde animal e sem provocar resistência ou deixar resíduos na carne.

Estudos avaliando o desempenho zootécnico de frangos de corte e o uso de ácidos orgânicos apresentam resultados controversos, provavelmente devido aos diferentes mecanismos de ação, condições ambientais, dose utilizada e parâmetros avaliados. Rezende et al. (2008) avaliaram diferentes níveis de inclusão de ácido acético (0; 0,5%; 1,0%, 1,5% e 2,0%) em rações de frango experimentalmente contaminadas com *Salmonella* e observaram que a inclusão do ácido em todos os níveis avaliados melhorou os parâmetros zootécnicos dos animais (ganho de peso e conversão alimentar), porém, no que se refere ao controle microbiológico, o uso do produto não foi satisfatório. Entretanto, estudos de Maiorka et al (2004) não observaram diferenças significativas no ganho de peso na fase de 1 a 21 dias de

idade de frangos tratados com uma mistura de ácidos fumárico (0,5%), láctico (5,13%), cítrico (5,4%) e ascórbico (1,2%) na ração. Vale et al (2004) utilizando uma mistura de ácido fórmico e propiônico verificaram que a inclusão de até 1% na ração não altera o desempenho dos animais. Porém a inclusão de 2% desta mistura promoveu um menor consumo de ração e de ganho de peso na fase inicial (1-21 dias). Skinner et al (1991), observaram que a inclusão de 0,125% de ácido fumárico na ração melhorou o ganho de peso de frangos aos 49 dias de idade e o consumo de ração foi maior quando incluiu-se 0,125 e 0,5% de ácido na dieta. A diferença entre as metodologias dos estudos podem justificar os resultados, pois além de se tratarem de diferentes ácidos e inclusões, provavelmente em condições de maior desafio sanitário, os ácidos orgânicos expressam melhor o seu potencial. Nos trabalhos avaliados, geralmente em ambientes com boas condições sanitárias o uso dos ácidos orgânicos não apresentou melhoras significativas no desempenho zootécnico sugerindo que seu uso seja indicado principalmente em granjas com altos desafios sanitários.

Dentre as vantagens do uso de ácidos orgânicos, foi verificado que a presença destes no intestino pode aumentar a produção de muco, seja pela estimulação dos receptores químicos conectados aos nervos colinérgicos ou por efeito direto nas células caliciformes (Vattay et al, 1988). A maior secreção de muco promove a proteção da parede intestinal contra agentes agressores da dieta, ou mesmo bactérias patogênicas, reduzindo sua presença no intestino. Os ácidos podem, ainda, estimular a proliferação de enterócitos, sugerindo melhora na capacidade de absorver os nutrientes (Sakata, 1987).

Leeson et al. (2005), verificaram que a adição de ácido butírico na dieta auxilia na manutenção da estrutura das vilosidades. Ácidos orgânicos como propiônico e

butírico podem ter ação trófica sobre a estrutura e o desenvolvimento intestinal, aumentando o tamanho dos vilos, a massa intestinal e a área de superfície de absorção (Sakata,1987). Entretanto, a literatura também é controversa no que se refere a estes aspectos, Salazar et al. (2008) não obtiveram resultados conclusivos com relação a altura de vilosidades e profundidade de criptas de frangos tratados com ácidos orgânicos (0,2% de ácido láctico e 0,05% de ácido butírico) na dieta, assim como Chaveerah et al. (2004), também não observaram diferenças significativas na estrutura intestinal em frangos desafiados com *Campylobacter* e tratados com ácidos orgânicos na água.

Diversos estudos relatam ainda o uso de ácidos orgânicos como controladores da microbiota de frangos de corte. Alp et al. (1999) avaliaram a suplementação de dietas de frangos com 0,1g/kg de bacitracina de zinco e/ou uma mistura de ácidos orgânicos (láctico, fumárico, propiônico, cítrico e fórmico - 3kg/ton) e observaram que houve redução na contagem de Enterobactérias no conteúdo intestinal do íleo dos animais tratados com ácidos em relação aqueles tratados com bacitracina de zinco. Porém quando houve a associação destes dois produtos obtiveram a menor contagem bacteriana, aos 42 dias de vida dos animais. Sterzo et al. (2007), utilizando 1,5 e 3,0 kg/ton de uma mistura comercial de ácidos orgânicos na ração de frangos observaram redução significativa na contagem de *Salmonella* Enteritidis em conteúdo cecal, quando comparado ao grupo controle (sem o aditivo) aos 3, 5 e 7 dias após a inoculação. Bassan et al. (2008) observaram que a adição de uma mistura de ácido fórmico e propiônico (4 kg/ton) na dieta de frangos reduz a colonização por *Salmonella* na tonsila cecal a partir do 18º dia após a inoculação, sendo que a bactéria foi eliminada a partir do 28º dia pós inoculação. Silva (2005) concluiu que os tratamentos com ácidos orgânicos na concentração de 30kg/ton

mostraram-se eficazes na inibição do crescimento da *Salmonella* sp. em rações avícolas, após 24h, 48h e sete dias de contato do produto com a ração contaminada. Heres et al (2004), avaliaram a eficácia de uma mistura de ácidos orgânicos (5,7% de ácido láctico e 0,7% de ácido acético) contra *Salmonella* e *Campylobacter*. O teste *in vitro* mostrou que estes ácidos são eficientes em eliminar estas bactérias, porém quando testados na dieta de frangos os autores observaram que o produto foi mais eficiente em eliminar o *Campylobacter* do que a *Salmonella*.

O uso de ácidos orgânicos na água antes do abate dos animais pode ser uma alternativa viável para redução de microorganismos patogênicos, como sugere Byrd et al. (2001) que observou redução na incidência de *Salmonella* e *Campylobacter* no papo e nas carcaças de frangos após o uso de uma solução de 0,5% de ácido acético, láctico e fórmico 8 horas antes do abate. Avila et al (2003) observaram redução na contagem de *Salmonella* no papo de frangos com a adição de mistura comercial de ácidos na água 24 horas antes do abate. Também foi observada redução na contagem de *Campylobacter* e de Enterobactérias no papo e no ceco de frangos inoculados com *Campylobacter* e tratados com mistura de ácidos orgânicos na água por 10 dias (Chaveerach et al. 2004).

Nava et al. (2009) utilizando técnicas de biologia molecular (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR) indicaram que o uso de ácidos orgânicos na água de frangos por 22 dias consecutivos afetam a população microbiana no íleo. Neste estudo, animais tratados com ácidos orgânicos apresentaram maior número de *Lactobacillus* e de bactérias totais em comparação com o grupo controle ou tratados com antibióticos. Os autores concluíram que ácidos orgânicos são uma alternativa viável ao uso de antibióticos por promoverem aumento nas bactérias benéficas do trato gastrointestinal e dessa forma reduzirem as patogênicas.

## CONCLUSÕES

Os resultados da literatura indicam que os diferentes efeitos obtidos com o uso dos ácidos orgânicos dependem da dose e do tipo de ácido utilizado, bem como das condições ambientais onde vivem os animais. Porém devido aos diferentes mecanismos de ação, muitas vezes, ácidos orgânicos necessitam maior tempo para demonstrar seus efeitos tanto como melhoradores de desempenho e como controladores da microbiota intestinal quando comparados a antibióticos. Apesar disso, fica evidente que o uso destes aditivos na produção de frangos pode trazer benefícios, seja no desempenho zootécnico dos animais, ou no controle da microbiota intestinal, reduzindo a contaminação por *Salmonella* e de outras bactérias patogênicas em toda a cadeia de produção.

## REFERÊNCIAS

- ALP, M.; KOCABAGLI, N.; KAHRAMAN, R.; BOSTAN, K. Effects of Dietary supplementation with Organic Acids and Zinc Bacitracin on Ileal Microflora, pH and Performance in Broilers. **Tr. Journal of Veterinary and Animal Sciences**, n. 23, p.451–455, 1999.
- ANDERSON, D.B.; MCCRACKEN, V.J.; AMINOV, R.J.; SIMPSON, J.M.; MACKIE, R.I.; VESTENGEN, M.V.A.; GASKINS, H.R. Pig News and Information. Gut Microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. **CABI International**, p. 115-122, 1999.
- AVILA, L.A.F.; NASCIMENTO, V.P.; CANAL, C.W.; SALLE C.T.P.; MORAES, H.L. DE S. Effect of Acidified Drinking Water on the Recovery of *Salmonella enteritidis* from Broiler Crops. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 5, n.3, p. 183 – 188, 2003.
- BASSAN, J. D.; FLÔRES, M. L.; ANTONIAZZI, T.; BIANCHI, E.; KUTTEL, J.; TRINDADE, M.M. Controle da infecção por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. **Ciência Rural**, v.38, n.7, 2008.
- BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v.75, n.12, p.5993-6007, 2007.
- BOPP, C.A.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALTER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM press, 2003. Cap.28, p.459–474.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003.

BYRD,J.A.; HARGIS,B. M.; CALDWELL,D.J.; BAILEY,R.H.; HERRON,K.L.; MCREYNOLDS,J.L.; BREWER, R.L.; ANDERSON,R.C.; BISCHOFF,K.M.; CALLAWAY,T.R.; KUBENA, L.F. Effect of Lactic Acid Administration in the Drinking Water During Preslaughter Feed Withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Broilers. **Poultry Science**, n. 80, p.278–283, 2001.

CENTER OF DISEASE CONTROL. *Salmonella* Surveillance: **Annual Summary**, 2006. Atlanta, Georgia: US Departament of heath and Human Services, CDC, 101p. 2008.

CHAVEERACH,P. ; KEUZENKAMP;D.A.; LIPMAN,L.J.A.; VAN KNAPEN,F. Effect of Organic Acids in Drinking Water for Young Broilers on *Campylobacter* Infection, Volatile Fatty Acid Production,Gut Microflora and Histological Cell Changes, **Poultry Science**, n. 83, p.330–334, 2004.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA, I . Organic Acids: Chemistry antibacterial activity and practical application. **Advances in Microbiological Phisiology**, v. 32, p.87-108, 1991.

DAY, C.A. Competitive exclusion in poultry: a review. **Worcessershire: Life-Care Products**. 1992. 18p.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, n.84, p.634-643, 2005.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids.s a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied and Poultry Research**, n. 11, p. 453-463, 2002.

EVERETT, M. L.; PALESTRANT,D.; MILLER,S.E.; BOLLINGER,R.R.; PARKER,W. Immune exclusion and immune inclusion: A new mode of host-bacterial interactions in the gut. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, n.4, p.321-332, 2004.

FULLER, R. Ecological studies in the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. **Journal of Applied Bacteriology**, v.36,p.131-139,1973.

GRAVE, K.; KALDHUSDAL, M.; KRUSE, H.; FEVANGHARR, L.M.; LATLANDSMO,K. What has happened in Norway after the ban of Avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry. **Preventive Veterinary Medicine**, n.62, p.59–72, 2004.

HART, A.; STAAG, L.A, J.; FRAME, M.; GRAFNNER,H.; GLISE,H.; FALK,P.; KAMM,M.A. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, p. 1383-1393, 2002.

HERES,L.; ENGEL,B.; URLINGS, H.A.P; WAGENAAR, J.A.; VAN KNAPEN,F. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, n. 99, 259–267, 2004.

HINTON, A. JR.; BUHR, R. J.; INGRAM, K. D. Reduction of *Salmonella* in the crop of broiler chickens subjected to feed withdrawal. **Poultry Science**, n. 79, p.1566-1570, 2000.



HIRSH, D. C. *Salmonella*. In: **Microbiologia Veterinária**, Editora Guanabara-Koogan SA., p.70-73, 2003.

KELLY, C.G.; YOUNSON, S. Anti-adhesive strategies in the prevention of infectious disease at mucosal surfaces. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v.9, p. 1711-1721, 2000.

LEESON, S.; NAMKUNG, H.; ANTONGIOVANNI, M.; LEE, E.H. Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 84, p. 1418 - 1422, 2005.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.A.; COX, M.M. Principles of Biochemistry. New York. **Worth Publishers**, 576p., 1993.

MACARI, M.A.; MAIORKA, A. Aspectos Fisiológicos da Qualidade Intestinal e Produtividade em Frangos de Corte. Departamento de Morfofisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias & Veterinárias, Campus Jaboticabal, 2001.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; BORGES, S. A.; OPALINSKI, M.; SILVA, A. V. F. Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascórbico em dietas iniciais de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 31-37, 2004.

MILES, R.O. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. 111: Alltech Biotechnology in the Feed and Oustry, **Proceedings**. p.133-50,1993.

NAVA M. G.; ATTENE-RAMOS, M.S.; GASKINS, H.R.; RICHARDS, J.D. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. **Veterinary Microbiology**, n.137, p.345–353, 2009.

REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; STRINGHINI, J. H.; CHAVES, L. S.; MINAFRA, C. S.; LAGE, M.E. Ácido acético em rações de frangos de corte experimentalmente contaminadas com *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p. 516-528, 2008.

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Organic acids as feed additives for Young pigs: nutritional and gastrointestinal effects. **Journal of Animal and Feed Science**, n. 8, p. 25-33, 1998.

RUSSEL, J.B. Another Explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.363-370, 1992.

SAKATA, T.; Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic factor. **British Journal of Nutrition**, v. 58, n. 95, p. 95-103, 1987.

SALAZAR, P.C.R.; ALBUQUERQUE, R.; TAKEARA, P. TRINDADE NETO, M.A.; ARAÚJO, L.F. Efeito dos ácidos láctico e butírico, isolados e associados, sobre o desempenho e morfometria intestinal em frangos de corte. **Brazilian Journal of Veterinary Reserch of Animal Science**, v. 45, n. 6, p. 463-471, 2008.

SILVA, L.C.C. Avaliação de um ácido orgânico como agente inibidor do crescimento de *Salmonella* sp em rações de aves. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Supl.7, p.219, 2005.

SKINNER, J.T.; IZAT, A.L.; WALDROUP, P.W. Research note: fumaric acid enhances performance of broiler chickens. **Poultry Science**, n. 70, v.6 , p.1444-1447, 1991(abstract).

SOLOMON, S.G.; FRYHLE, C. Química Orgânica, 7 ed.. Rio de Janeiro: **LTC Livros Técnicos e Científicos**, v.1 e 2, 2002.

STERZO, E.V.; PAIVA, J.B.; MESQUITA, A.L.; FREITAS NETO, O.C.; BERCHIERI, Jr A. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enterica* serovar Enteritidis experimental infection in chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9 , n.1 p. 69 – 73, 2007.

STRATFORD, M.; PLUMRIDGE, A.; NEBE-VON-CARON, G.; ARCHER, D.B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 37-43, 2009.

TANNOCK, O.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, v.8, p.527-533, 1998.

THOMPSON, K.L.; APPEGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. **Poultry Science**, v.85, p.1535–1540, 2006.

UTIYAMA, C.A.; OETTING, L.L.; GIANI, P.A. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2359-2367, 2006.

VALE, M.M.; MENTEN, J.F.M.; MORAIS, S.C.D.; BRAINER, M.M.A. Mixture of formic and propionic acid as additives in broilers feeds. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 371-375, 2004.

VAN DER WIELEN, P.W.; BIESTERVELD, S.; NOTERMANS, S.; HOFSTRA, H.; URLINGS, B.A.P.; VAN KNAPEN, F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 66, p. 2536–2540, 2000.

VATTAY, P.; FEIL, W.; KLIMESCH, S.; WENZL, E.; STARLINGER, M.; SCHIESSLER, R. Acid stimulated alkaline secretion in the rabbit duodenum is passive and correlates with mucosal damage. **Gut**, v. 29, p. 284-290, 1988.

ZHU, X.Y., ZHONG, T., PANDYA, Y., JOERGER, R., 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 68, 124–137, 2002.

## **CAPÍTULO 2**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, HISTOLÓGIA E IMUNOLÓGICA DE  
FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *SALMONELLA*  
*ENTERICA ENTERICA* SOROVARES ENTERITIDIS E MINNESOTA E  
TRATADOS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS.**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, HISTOLÓGIA E IMUNOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERICA ENTERICA* SOROVARES ENTERITIDIS E MINNESOTA E TRATADOS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS.**

*(Microbiological, Histopathological and Immunological evaluation of Broiler Chickens challenged with Salmonella enterica enterica serovars Enteritidis and Minnesota and treated with Organic Acids)*

**RESUMO**

Para avaliar a eficiência de ácidos orgânicos frente a *Salmonella enterica enterica* sorovar Enteritidis (SE) e Minnesota (SM) em frangos, foram desenvolvidos dois experimentos. No primeiro experimento foram avaliados 3 tratamentos: T1 – ração adicionada de ácido orgânico; T2 – ração adicionada de ácido orgânico e ácido orgânico na água de bebida; T3 – grupo controle. Todos os animais foram inoculados com SE. A utilização de ácidos orgânicos na ração (T1) e na ração e na água (T2) diminuíram a excreção de *Salmonella* no papo e no ceco 7 dias pós inoculação com SE e houve redução de células CD3+ no jejuno dos frangos. No segundo experimento foram avaliados 4 tratamentos sendo T1 – controle sem inoculação e sem adição de ácidos orgânicos; T2 – controle inoculado com *Salmonella* Minnesota (SM) e sem adição de ácidos orgânicos; T3 – animais inoculados com SM e adição de ácidos orgânicos na ração e T4 - animais inoculados com SM e adição de ácidos orgânicos na ração e na água de bebida. O uso de ácidos orgânicos na ração e na ração e na água são mais eficazes em reduzir SE do que SM.

**Palavras-Chave:** células CD3+; citometria de fluxo; imuno-histoquímica.

**ABSTRACT**

Two experiments were carried out to evaluate effectiveness of organic acid against *Salmonella enterica enterica* serovars Enteritidis (SE) and Minnesota (SM) in broilers. In first experiment three treatments were evaluated: T1 - feed with organic acid; T2 - feed with organic acid and organic acid in drink water ; and T3 - control group. All animals were inoculated with SE. Organic acids in feed (T1) and organic acids in feed and drink water (T2) reduced the shedding of *Salmonella* in crop and cecum 7 days post-inoculation with SE and reduced the CD3+ cells in jejunum mucosa of broilers. The second experiment four treatments were evaluated. T1 – control group, without inoculation and organic acids; T2 – control group inoculated with *Salmonella* Minnesota (SM); T3 – animals inoculated with SM and treated with organic acids in feed; T4 – animals inoculated with SM and treated with organic acids in feed and in drink water. The use of organic acids in feed and in water is more effective to control SE than SM.

**Key-words:** CD3+ cells; flow cytometric; immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma enfermidade de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias e se constitui em importante barreira ao comércio internacional de alimentos devido seu potencial zoonótico. A ampla distribuição de *Salmonella* entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (Butaye et al., 2003). O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende as espécies *S. enterica* e *S. bongori*; a espécie *S. enterica* alberga as linhagens patogênicas distribuídas em seis subespécies e 2.564 sorovares, todas patogênicas ao homem (Bopp et al., 2003) onde incluem-se a *Salmonella enterica enterica* sorovar Enteritidis (SE) e a *Salmonella enterica enterica* sorovar Minnesota (SM).

Segundo o relatório anual do *Center of Disease Control* (2008) no período de 1996 a 2006 nos Estados Unidos foram diagnosticados 75.058 casos de *S. Typhimurium*; 69.547 casos de *S. Enteritidis* e 340 casos de *S. Minnesota* em seres humanos. A *Salmonella* Enteritidis e a *Salmonella* Typhimurium também são os sorovares mais frequentemente isolados em produtos de origem avícola, porém atualmente outros sorovares estão sendo isolados, dentre eles o Minnesota. É verdade, que devido ao mecanismo de exclusão competitiva alguns sorovares podem ser mais eficientes que outros em seu estabelecimento dentro da microbiota dos animais e que, uma vez estes sendo controlados, outros sorovares começam a ser mais freqüentemente isolados. Por outro lado, ainda não é possível afirmar se os atuais métodos de controle de salmonelose em frangos são realmente efetivos contra todos os sorovares identificados.

Um dos métodos atuais de controle da salmonelose em frangos é a adição de ácidos orgânicos na ração e na água dos animais. Ácidos orgânicos são constituintes naturais de plantas e animais. Alguns podem ser formados através da fermentação microbiana no intestino e outros nas rotas metabólicas intermediárias (Lehninger et al. 1993). Como grupo químico os ácidos orgânicos são considerados como sendo qualquer substância de estrutura geral R-COOH, gerando grupos de compostos relacionados, conhecidos como derivados dos ácidos carboxílicos, como os aminoácidos, ácidos graxos, coenzimas e metabólitos intermediários (Solomon e Fryhle, 2002). Aqueles associados com atividade antimicrobiana são os ácidos graxos de cadeia curta, tanto monocarboxílicos, como fórmico, acético, propiônico e o butírico ou carboxilados com o grupo hidroxila como láctico, málico, tartárico e o cítrico. O principal mecanismo de ação dos ácidos refere-se à Teoria dos Ácidos Fracos, exercendo atividade antimicrobiana devido a redução do pH no interior da célula microbiana (Cherrington et al. 1991; Roth, 1998). De acordo com essa teoria, a forma não dissociada do ácido é lipossolúvel e nessa forma tem capacidade de atravessar de forma passiva a membrana celular. No interior da célula o ácido se dissocia alterando o pH citoplasmático, modificando o gradiente de prótons e a carga elétrica com o exterior celular. Isso interfere no sistema de transporte de aminoácidos e fosfatos além de inativar enzimas (Russel, 1992). Outra consequência é o aumento da pressão osmótica celular devido aos mecanismos de compensação de carga elétrica aumentando os níveis de sódio, potássio ou glutamato e a força iônica intracelular, provocando um aumento da pressão mecânica sobre a parede do microorganismo, o que faz com que essa se rompa (Russel, 1992). Entretanto, Stratford et al (2009) demonstraram que nem todos os ácidos orgânicos necessitam reduzir o pH no citoplasma para exercer sua atividade

antimicrobiana. Por exemplo, no caso do ácido sórbico, observa-se que concentrações inibitórias deste ácido não reduzem o pH citoplasmático e acredita-se que a membrana citoplasmática seja o primeiro sítio de ação deste ácido. A lesão da membrana, a perda da sua integridade e o aumento a permeabilidade a prótons causariam a morte do microorganismo.

O objetivo do presente estudo foi conhecer e avaliar a capacidade de redução de ácidos orgânicos via ração e via ração e água em aves desafiadas com *Salmonella enterica enterica sorovar* Enteritidis (SE) e *sorovar* Minnesota (SM).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram desenvolvidos dois experimentos sendo o experimento 1 com animais inoculados com *Salmonella* Enteritidis (SE) e o experimento 2 com animais inoculados com *Salmonella* Minnesota (SM). Toda metodologia de estudo foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em experimentação animal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná com protocolo número 008/2009.

### *Experimento 1*

#### **Animais, Dietas e Ambiente**

Foram alojados 180 frangos de corte distribuídas em 3 tratamentos, com 4 repetições de 15 animais cada em um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo T1 – ração adicionada de ácido orgânico (2kg/ton); T2 – ração adicionada de ácido orgânico (2kg/ton) e ácido orgânico na água de bebida (120g/1000L) durante 5 dias após inoculação com SE e T3 – grupo controle inoculado com SE, sem adição de ácidos orgânicos na ração ou na água.

Os ácidos orgânicos adicionados na ração dos animais constituíam-se de uma mistura comercial (NEOACID®) de ácido láctico (140g/Kg), ácido fumárico (45 g/Kg),



ácido cítrico (50g/Kg) e ácido fórmico (100g/kg) e o ácido orgânico solúvel adicionado na água de bebida dos animais (Acidificante Solúvel Sanex®) era composto de ácido fumárico (270g/kg) e ácido cítrico (280g/Kg).

Os animais dos tratamentos 1 e 2 receberam a mistura comercial de ácidos orgânicos na ração desde o primeiro até o último dia de vida. E os animais do tratamento 2 passaram a receber o ácido orgânico na água de bebida, 24h após a inoculação com SE, por um período de 5 dias.

As aves foram mantidas do 1° ao 21° dia de vida em temperatura ideal de conforto para a idade das aves, com fornecimento de água e ração à vontade, sendo alimentadas com ração balanceada em níveis iguais ou superiores recomendados pelo NRC (1994), sem presença de coccidiostático e promotores de crescimento.

Os animais foram criados em baterias, no mesmo ambiente e em contato direto onde não era possível a existência de um grupo não inoculado com SE.

### **Desempenho zootécnico**

Para avaliação do desempenho zootécnico, do 1° ao 21° dia de vida, as aves, a ração fornecida e a sobra foram pesadas para cálculo da ração consumida, ganho de peso e conversão alimentar, que foi calculada dividindo-se a ração consumida pelo ganho de peso das aves. As aves que morreram foram pesadas para correção do ganho de peso e conversão alimentar.

### **Cepa e Inoculação**

A cepa de *Salmonella* Enteritidis utilizada neste experimento foi isolada de frangos de corte e enviada para o setor de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz para reconhecimento e tipificação. A cepa do inóculo e as isoladas nas análises microbiológicas também foram enviadas para análise e confirmação no mesmo instituto.

Para o preparo do inóculo, uma colônia de *Salmonella* Enteritidis foi retirada do Agar estoque e incubada em solução de BHI (Brain Heart Infusion) por 24h a 37°C. Em seguida, semeou-se esta solução em uma placa de Agar Mueller Hinton por 24h a 37°C. A placa foi lavada, com solução fisiológica estéril, e retirou-se o líquido que foi diluído até a concentração 0,5 da escala de MacFarland, que corresponde a concentração  $10^8$  de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Salmonella* Enteritidis/mL. Fez-se diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de solução fisiológica estéril até a concentração  $10^5$  UFC/mL. Procedeu-se a contagem das UFC do inóculo em Agar para Contagem de Colônias.

Aos 14 dias de idade todos os animais foram inoculados com 1mL de solução de *Salmonella* Enteritidis na concentração de  $10^5$  UFC/mL via oral.

### **Análise Microbiológica**

Foram realizados suabes de cloaca de todos os animais, 48 horas pós inoculação com SE sendo 3 *pool* de 5 animais por repetição (12 amostras por tratamento), e posterior análise de *Salmonella* spp. No 21º dia de idade as aves foram eutanasiadas e necropsiadas, onde coletou-se assepticamente fragmentos de papo e ceco (aproximadamente 10g de órgão e conteúdo) de 3 animais por repetição (12 amostras por tratamento), e realizou-se análise de *Salmonella* spp.

Para realização do procedimento de contagem de *Salmonella* os suabes de cloaca, os papos e os cecos foram diluídos em água peptonada 2% em proporção de 1:9. Retirou-se 1 mL da solução de água peptonada 2% que foi pipetado no tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-3}$ , posteriormente retirou-se 100  $\mu$ L de cada diluição que foi dispensado em placas em duplicata em meio XLD (Xilose Lisina Desoxicolato, Oxoid®) e com uma alça de *drigalsky* espalhou-se o líquido nas placas. As placas foram incubadas em estufa

regulada a 35°C por 24h e submetidas a posterior contagem das colônias típicas que foram submetidas a sorologia, com soro Polivalente, para confirmação e enviadas ao Instituto Oswaldo Cruz para tipificação. (adaptado de Desmidt et al. 1998).

A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada à 35°C por 24h, após esse período, passou-se 100 µL da solução inicial para caldo Rappaport-Vassiliadis e incubou-se em estufa 42°C por 24h, para confirmação da presença/ausência de *Salmonella*.

Os resultados das contagens de colônias foram realizados de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003 (BRASIL - MAPA).

### **Necropsia**

Aos 21 dias de idade, 3 animais de cada repetição (12 por tratamento) foram eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiados para coleta de forma asséptica de papo e ceco para análise microbiológica. Também foram coletados fragmentos de duodeno, jejuno, íleo e ceco em formalina tamponada a 10% para avaliação histológica, morfométrica e imuno-histoquímica.

### **Histopatologia e Morfologia Intestinal**

As amostras de duodeno, jejuno, íleo e ceco foram processadas rotineiramente para histologia e coradas com Alcian Blue. As variáveis avaliadas nos intestinos foram altura de vilo, profundidade de criptas, relação vilo/cripta e contagem de células caliciformes, com leitura de 20 vilos por tratamento em um aumento de 40X. As análises morfométricas do epitélio intestinal foram feitas em microscopia de luz em um sistema de captura de imagens (Motic Images Plus 2,0-Motic China Group Co. 2006) acoplado a um microscópio (Olympus BH2 Olympus America INC, NY, USA).

### **Imuno-histoquímica**

As seções de intestino para imuno-histoquímica foram desparafinadas em estufa a 60°C por 10 minutos e re-hidratadas em xilol e álcool. A recuperação antigênica foi realizada com Tampão Citrato pH 6,0 em banho-maria 100°C por 20 minutos com bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% e proteína bloqueadora, por 8 e 5 minutos respectivamente. O anticorpo primário utilizado foi o anti-CD3, diluído 1:700 por 90 minutos. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo em um mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 40 minutos e para revelação utilizou-se um cromógeno, kit DAB®, por 5 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina por 5 minutos após a desidratação e montagem das lâminas sinalizadas.

As análises imuno-histoquímicas dos segmentos intestinais foram feitas em microscopia de luz, em um sistema analisador de imagens (Motic Images Plus 2,0- Motic China Group Co. 2006) acoplado a um microscópio (Olympus BH2 Olympus America INC, NY, USA). Nas amostras de duodeno, jejuno, íleo e ceco foi realizada a quantificação de células CD3 positivas por campo em aumento de 100X, com leitura de 10 vilos por tratamento.

### **Citometria de fluxo**

Aos 21 dias de vida das aves foram coletados sangue de 4 animais por tratamento (sendo 1 por repetição) utilizando anticoagulante heparina. As células mononucleares foram separadas do sangue total através de gradiente de densidade usando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo estabelecido por Fair et al (2008). O sangue foi diluído 1:1 com solução de PBS estéril para um volume total de 2 mL. Esta diluição foi mergulhada em 3 mL de Histopaque-1077 em

um tubo de 15 mL. As amostras foram centrifugadas em 400g, por 30 minutos em temperatura ambiente. O *buffy coat* resultantes de células brancas acima dos eritrócitos foi então coletado e transferido para outro tubo de 15 ml. As células foram lavadas duas vezes com 4 mL de PBS e centrifugado a 400g por 7 minutos. O sedimento final foi ressuspensão em 1 mL de solução de paraformaldeído em PBS 1% para a fixação das células. Trinta minutos após a ressuspensão, as células foram centrifugadas a 400g por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugado a mesma velocidade e tempo e sedimento final foi ressuspensão em PBS com BSA 1%. As células foram contadas utilizando uma câmara de contagem de Neubauer. Coloração única foi realizada para todos os anticorpos, usando 2µL do anticorpo primário diluído em 20 mL de PBS (pH 7,4). Esta diluição foi então misturada com  $10^6$  células mononucleares e mantido à temperatura ambiente no escuro por 20 minutos. Após este período de incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS, centrifugado a 400g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado. As células receberam o anticorpo secundário (5µL diluição de 1:200) ou Estreptavidina FITC (diluídos 1 mL: 10µL de PBS), de acordo com a exigência. As células foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro, e em seguida lavado com 2 mL de PBS e centrifugado. O sedimento final foi ressuspensão em 250µL de PBS com BSA 1%. Todas as amostras passaram por citometria de 2 horas de coloração. A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Fluorescência verde (fluorescência de FITC) foi detectada no canal FL1 (nm 530/30), e fluorescência laranja foi detectada no canal FL2 (nm 585/42). As células foram analisadas em até 10.000 eventos no gate de linfócitos (com base na frente e

dispersão lateral), inclusive contaminando trombócitos. Os dados foram analisados com o “software FlowJo”.

## *Experimento 2*

### **Animais, Dietas e Ambiente**

Foram alojados 72 frangos de corte distribuídas em 4 tratamentos com 18 animais cada em um delineamento experimental inteiramente casualizado onde cada animal era uma repetição; sendo T1 – controle sem inoculação e sem adição de ácidos orgânicos; T2 – controle inoculado com *Salmonella* Minnesota (SM) e sem adição de ácidos orgânicos; T3 – animais inoculados com SM e adição de ácidos orgânicos na ração (2kg/ton) e T4 - animais inoculados com SM e adição de ácidos orgânicos na ração (2kg/ton) e na água de bebida (120g/1000L) 3 dias após inoculação administrado durante 3 dias.

Os ácidos orgânicos utilizados foram os mesmos do primeiro experimento. Os animais dos tratamentos 3 e 4 receberam a mistura comercial de ácidos orgânicos na ração desde o primeiro até o 28° dia de vida. E os animais do tratamento 4 passaram a receber o ácido orgânico na água de bebida, 72h após a inoculação com SM, por um período de 3 dias.

As aves foram mantidas do 1° ao 28° dia de vida em temperatura ideal de conforto para a idade das aves, com fornecimento de água e ração à vontade, sendo alimentadas com ração balanceada com níveis iguais ou superiores recomendados pelo NRC (1994), sem presença de coccidiostático e promotores de crescimento.

Neste experimento os animais foram alojados em salas individuais, com controle de ambiência, onde não existia contato entre os diferentes grupos, sendo possível a existência de um grupo não inoculado com SM.

A preparação do inóculo de *Salmonella*, análise microbiológica, análise histopatológica e de imuno-histoquímica foram iguais as descritas no experimento 1.

### **Cepa e Inoculação**

Aos 21 dias de idade os animais dos tratamentos 2, 3 e 4 foram inoculados por via oral com 1mL de solução de *Salmonella* Minnesota na concentração de  $10^8$  UFC/mL. A cepa de SM isolada de frangos de corte foi submetida a análise e tipificação no Instituto Oswaldo Cruz para confirmação do sorovar, assim como aquelas isoladas nas análises microbiológicas do experimento.

### **Coleta de amostras para microbiologia, histopatologia e imuno-histoquímica**

No dia da chegada, seis animais foram eutanaziados e necropsiados e coletou-se de forma asséptica, ceco, fígado e coração para análise de *Salmonella*. Foram realizados suabes de cloaca 48 horas pós inoculação de SM (22 dias de idade) sendo *pool* de 4 animais por tratamento e posterior análise de *Salmonella*. No 28º dia de idade e sete dias após inoculação com SM, 18 aves por tratamento foram eutanasiadas e necropsiadas, onde coletou-se assepticamente papo e ceco e realizou-se análise de *Salmonella* e de 5 animais de cada tratamento foram coletados fragmentos de duodeno, jejuno, íleo e ceco em formalina tamponada a 10% para avaliação histológica, morfométrica e imuno-histoquímica. Os procedimentos de análise de *Salmonella*, de coloração e leitura das lâminas para histopatologia e imuno-histoquímica foi igual ao realizado no experimento 1.

### **Análise Estatística**

Os resultados dos experimentos 1 e 2 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico StatView for Windows Copyright® 1998 (SAS Institute Inc., NC, USA) e as médias de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar do experimento 1 foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%

de probabilidade. As medias de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de SE e SM foram transformadas em Log10 e submetidas ao teste T, ou quando não foi possível a contagem pela baixa expressão de UFC nas placas, as amostras positivas e negativas foram submetidas ao teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e posterior teste de comparação a 5% de probabilidade. As médias de morfometria da mucosa intestinal, expressão de células CD3+ na mucosa intestinal por imuno-histoquímica foram submetidas ao teste de T. As células avaliadas em citometria de fluxo foram submetidas ao teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e posterior teste de comparação a 5% de probabilidade.

Para comparar a eficácia do produto via água e via ração para os diferentes sorovares de *Salmonella* foi realizado o cálculo da porcentagem de redução de excreção de *Salmonella* em relação ao grupo controle inoculado de cada experimento e esta porcentagem de redução comparado pelo teste de Qui-quadrado.

## **RESULTADOS**

### *Experimento 1*

#### **Desempenho zootécnico**

Na tabela 1 encontram-se os resultados do desempenho zootécnico dos animais do 1° ao 21° dia de idade, onde foi avaliado o consumo de ração total (CRT), consumo de ração médio (CRM), ganho de peso total (GPT), ganho de peso médio (GPM) e conversão alimentar (CA). Não foram observadas diferenças significativas no período avaliado (1-21 dias de idade) e nos parâmetros zootécnicos avaliados. Porém numericamente observamos que os ácidos orgânicos apresentaram melhores resultados no que se refere a ganho de peso médio (GPM) e conversão alimentar (CA).



**Tabela 1:** Média e desvio padrão do Consumo de ração Médio (CRM), Ganho de peso total (GPT), Ganho de peso médio (GPM) e Conversão alimentar (CA) de 1-21 dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamento	CRM (g)	GPT (g)	GPM (g)	CA
AO* na ração	1123,8±26,8	11136,7±1072,6	751,3±58,5	1,504±0,138
AO na ração e na água	1111,8±18,8	10883,7±216,5	728,0±14,1	1,528±0,03
Controle	1101,2±37,1	10198,2±710,4	691,5±53,0	1,597±0,091

\*AO : ácido orgânico

### Análise de *Salmonella*

Na tabela 2 estão apresentados os dados referentes a contagem de *Salmonella* Enteritidis (SE) em suabe de cloaca 48 horas pós inoculação (PI) com SE e de amostras positivas em relação ao total de amostras em ceco e papo 7 dias pós inoculação com SE. Para os sete dias PI, houve apenas crescimento bacteriano após enriquecimento em meio seletivo, de maneira que foi preferível utilizar o critério presença/ausência. Observa-se que o ácido orgânico na ração ou na ração e na água mostrou-se eficaz em combater a colonização de SE no ceco e no papo de frangos, reduzindo significativamente o número de amostras positivas para esta bactéria, quando comparado ao grupo controle, entretanto isso não se observa na contagem de amostras de suabes 48 horas após a inoculação, onde não houve diferença significativa entre os tratamentos.

**Tabela 2** - Média e desvio padrão da Contagem de *Salmonella* Enteritidis (SE), Log<sub>10</sub> UFC, em suabe de cloaca (48h pós-inoculação com SE). Número de amostras positivas em relação ao total de amostras para SE em ceco e papo de frangos de corte 7 dias pós-inoculação com SE, nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Suabe de cloaca 48h PI	Ceco - Amostras positivas (7dias PI)	Papo - Amostras positivas(7dias PI)
AO* na ração	2,60±1,62	2/12 a	4/12 a
AO na ração e na água	2,20±1,66	1/12 a	4/12 a
Controle	2,85±1,64	11/12 b	10/12 b

\*AO: ácido orgânico, PI: pós inoculação com *Salmonella* Enteritidis.

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$  ao teste de Qui-quadrado.

### **Morfologia Intestinal e Imuno-histoquímica**

Na tabela 3 estão apresentados os resultados relativos a tamanho de vilosidade ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de criptas ( $\mu\text{m}$ ), relação vilosidade/cripta, contagem de células caliciformes e contagem de células CD3+/campo em duodeno, jejuno, íleo e ceco, aos 21 dias de idade, 7 dias após inoculação nos diferentes tratamentos.

Com relação a altura de vilosidade em duodeno, obteve-se menor altura no grupo tratado somente com ácido orgânico na ração quando comparado aos demais grupos. Em jejuno, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No íleo dos animais tratados com ácidos orgânicos na ração e na ração e na água observa-se altura de vilosidade significativamente menor quando comparado ao grupo controle. Em ceco, observa-se menor altura de vilosidade no grupo tratado com ácidos orgânicos na ração e na água quando comparado ao grupo onde utilizou-se somente ácido na ração.

Não foi observado diferenças significativas na variável profundidade de cripta em duodeno e íleo entre os tratamentos. Porém, em jejuno obteve-se maior profundidade no grupo controle quando comparado aos demais grupos. No ceco observou-se menor profundidade no grupo tratado com ácidos na ração e na água quando comparado aos demais grupos.

Na relação altura de vilosidade/profundidade de cripta obteve-se relação significativamente maior em duodeno no grupo controle e em jejuno observa-se menor relação no grupo controle se comparado aos demais grupos. Em íleo e ceco não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Com relação a variável número de células caliciformes em duodeno e ceco não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Em jejuno, o grupo controle inoculado obteve maior número de células caliciformes quando comparado

aos demais grupos analisados. Em íleo, o grupo tratado com ácidos orgânicos somente na ração obteve menor número de células caliciformes, quando comparado aos demais grupos.

Com relação a presença de células CD3+ na mucosa intestinal observa-se somente diferenças estatísticas em jejuno onde o grupo controle inoculado com SE apresentou maior número de células quando comparado aos demais grupos.

**Tabela 3** – Média e desvio padrão da altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de criptas ( $\mu\text{m}$ ), relação vilo/cripta, contagem de células caliciformes, contagem de células CD3+/campo em duodeno, jejuno, íleo e ceco (21 dias de idade e 7 dias pós inoculação com *Salmonella* Enteritidis) nos diferentes tratamentos.

Duo	Vilo	AO* na ração	AO na ração e na água	Controle
	Cripta	971,4 $\pm$ 221,9 <sup>b</sup>	1138,5 $\pm$ 300,4 <sup>a**</sup>	1284,4 $\pm$ 234,2 <sup>a</sup>
	Vilo/Cripta	97,1 $\pm$ 27,1	99,5 $\pm$ 30,0	83,3 $\pm$ 17,0
	Caliciforme/Vilo	10,7 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	12,3 $\pm$ 4,6 <sup>b</sup>	16,0 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>
	CD3+/Campo	160,9 $\pm$ 35,8	165,3 $\pm$ 36,6	178,6 $\pm$ 54,5
		16,9 $\pm$ 3,7	18,9 $\pm$ 3,5	17,8 $\pm$ 5,1
Jej	Vilo	1256 $\pm$ 268,3	1225,4 $\pm$ 225,8	1288,0 $\pm$ 188,8
	Cripta	105,1 $\pm$ 26,1 <sup>b</sup>	107,2 $\pm$ 20,8 <sup>b</sup>	145,3 $\pm$ 17,9 <sup>a</sup>
	Vilo/Cripta	12,7 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	11,6 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	9,0 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>
	Caliciforme/Vilo	132,6 $\pm$ 36,2 <sup>b</sup>	120,6 $\pm$ 24,1 <sup>b</sup>	152,8 $\pm$ 33,7 <sup>a</sup>
	CD3+/Campo	14,0 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	15,5 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>	23,6 $\pm$ 6,9 <sup>a</sup>
Íleo	Vilo	498,5 $\pm$ 65,6 <sup>b</sup>	514,4 $\pm$ 88,7 <sup>b</sup>	663,8 $\pm$ 98,3 <sup>a</sup>
	Cripta	79,1 $\pm$ 17,0	97,7 $\pm$ 16,4	121,5 $\pm$ 31,4
	Vilo/Cripta	6,5 $\pm$ 1,5	5,3 $\pm$ 1,0	5,9 $\pm$ 2,0
	Caliciforme/Vilo	129,7 $\pm$ 21,7 <sup>a</sup>	101,1 $\pm$ 32,0 <sup>b</sup>	138,6 $\pm$ 21,2 <sup>a</sup>
	CD3+/Campo	18,9 $\pm$ 6,1	17,0 $\pm$ 2,2	23,50 $\pm$ 4,5
Ceco	Vilo	276,5 $\pm$ 81,6 <sup>a</sup>	212,6 $\pm$ 47,0 <sup>b</sup>	243,4 $\pm$ 59,3 <sup>ab</sup>
	Cripta	131,6 $\pm$ 41,7 <sup>a</sup>	99,8 $\pm$ 24,5 <sup>b</sup>	124,8 $\pm$ 41,2 <sup>a</sup>
	Vilo/Cripta	2,3 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 1,1
	Caliciforme/Vilo	8,9 $\pm$ 5,7	9,2 $\pm$ 5,1	12,0 $\pm$ 9,3
	CD3+/Campo	19,2 $\pm$ 7,5	14,0 $\pm$ 4,0	17,4 $\pm$ 4,0

\*AO: ácido orgânico; Duo= duodeno, jej= jejuno

\*\*Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05).

### Citometria de fluxo

Na tabela 4 estão apresentados os dados de citometria de fluxo aos 21 dias de idade dos animais e 7 dias pós-inoculação com SE, nos diferentes tratamentos.

Observa-se significativamente ( $P < 0,05$ ) maior proporção de células CD4, CD28 e nos receptores de linfócitos de mucosa TCR  $\alpha\beta$  V $\beta$ 1 e TCR  $\alpha\beta$  V $\beta$ 2 no sangue de animais do grupo tratado somente com ácido na ração, quando comparado aos demais grupos.

**Tabela 4** – Média e Desvio padrão das proporções de células circulantes no sangue de frangos de corte aos 21 dias de idade e após 7 dias da inoculação com SE, de acordo com a subpopulação identificada (ou a razão entre as populações CD4+ e CD8+).

Molécula de superfície	AO* na ração	AO na ração e na água	Controle
CD4	41,53±13,83% <sup>a**</sup>	15,34±4,66% <sup>b</sup>	15,17 ± 3,18% <sup>b</sup>
CD8 $\alpha$	17,50±4,31%	9,50±10,08%	7,11 ± 1,85%
CD8 $\alpha^{\text{Hight}}$	1,16±0,43%	0,60±0,53%	0,33 ± 0,17%
CD28	54,72±22,5 <sup>a</sup>	24,17±9,41% <sup>b</sup>	17,48 ± 7,80% <sup>b</sup>
CD4:CD8 $\alpha$	2,33±0,27	2,88±1,81	2,24 ± 0,69
CD8 $\beta$	6,75±3,70%	4,33±2,30%	2,66 ± 0,62%
MHC I	3,60±1,40%	1,50±0,38%	1,14 ± 0,50%
MHC II	20,87±12,90%	10,86±2,02%	11,78±4,31%
MHC II <sup>Bright</sup>	1,75±0,80%	1,97±0,87%	0,99 ± 0,36%
TCR $\alpha\beta$ V $\beta$ 1	40,21±19,75% <sup>a</sup>	13,10±5,5% <sup>b</sup>	8,25 ± 2,98% <sup>b</sup>
TCR $\alpha\beta$ V $\beta$ 2	19,16±4,26% <sup>a</sup>	7,22±5,43% <sup>b</sup>	4,60±1,09% <sup>b</sup>

\*AO: ácido orgânico

\*\*Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste do Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ).

## Experimento 2

### Análise de *Salmonella*

A análise dos fragmentos das seis aves eutanaziadas e necropsiadas no primeiro dia apresentaram resultados negativos para presença/ausência de *Salmonella*.

A tabela 5 apresenta os resultados da média e desvio padrão da Contagem de *Salmonella* Minnesota (SM), resultados transformados em Log10 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) em suabe de cloaca 48 horas após inoculação (22 dias de idade), em papo e em ceco aos 7 dias após inoculação com SM (28 dias de idade).

É possível observar que 48 horas após inoculação com *Salmonella* Minnesota todos os animais inoculados apresentavam excreção de *Salmonella*. Observa-se que em papo com 7 dias pós inoculação os tratamentos com ácido orgânico na ração e ácido orgânico na ração e na água obtiveram menor contagem de *Salmonella*, quando comparado ao controle positivo. Em ceco não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com ácidos orgânicos e o grupo inoculado sem tratamento. O controle negativo (não inoculado com SM) não apresentou contagem de SM em nenhum período.

**Tabela 5** – Média e desvio padrão da Contagem de *Salmonella* Minnesota (SM), Log<sub>10</sub> UFC/g, em suabe de cloaca (48h pós-inoculação com SM), papo e ceco de frangos de corte (7 dias pós-inoculação com SM).

Tratamentos	Suabes de cloaca (48h PI)	Papo (7 dias PI)	Ceco (7 dias PI)
Controle Negativo	0,0±0,00 b**	0,0±0,00 c	0,0±0,00 b
Controle Positivo	5,0±0,40 a	3,8±1,40 a	4,7±1,00 a
AO* na ração	5,0±0,32 a	2,5±1,50 b	4,6±1,50 a
AO na ração e na água	4,8±0,30 a	2,0±1,60 b	3,8±1,60 a

\*AO: ácido orgânico

\*\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

### Morfologia intestinal e Imuno-histoquímica

A tabela 6 apresenta os resultados da média e do desvio padrão da altura de vilosidade (µm), profundidade de criptas (µm), relação vilo/cripta, contagem de células caliciformes, contagem de células CD3+/campo em duodeno, jejuno, íleo e ceco de frangos nos diferentes tratamentos aos 28 dias de idade e 7 dias pós inoculação com *Salmonella* Minnesota.

Com base nos resultados da Tabela 6, observa-se que com relação a altura de vilosidade, não foram encontradas diferenças significativas (P<0,05) em duodeno. Porém em jejuno obteve-se menor altura de vilosidade no tratamento onde foi utilizado ácido orgânico na ração e na água quando comparado aos demais tratamentos. Em íleo obteve-se menor altura de vilosidade (P<0,05) no grupo tratado somente com ácido orgânico na ração quando comparado aos demais tratamentos.

Em ceco, o grupo não inoculado e grupo inoculado com SM e tratado com ácido orgânico na ração e na água obtiveram maior altura de vilosidade quando comparado aos demais grupos.

**Tabela 6** – Média e desvio padrão da altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de criptas ( $\mu\text{m}$ ), relação vilo/cripta, contagem de células caliciformes, contagem de células CD3+/campo em duodeno, jejuno, íleo e ceco (28 dias de idade e 7 dias pós inoculação com *Salmonella* Minnesota) nos diferentes tratamentos.

		Controle negativo	Controle positivo	AO* na ração	AO na ração e na água
<b>Duo</b>	<b>Vilo</b>	1644,1 $\pm$ 505,7	1489,8 $\pm$ 265,7	1328,2 $\pm$ 533,0	1765,4 $\pm$ 186,6
	<b>Cripta</b>	201,6 $\pm$ 100,0	134,7 $\pm$ 46,7	133,1 $\pm$ 48,8	152,1 $\pm$ 56,5
	<b>Vilo/Cripta</b>	9,35 $\pm$ 4,4	12,0 $\pm$ 4,1	10,2 $\pm$ 3,2	12,9 $\pm$ 4,5
	<b>Caliciforme/Vilo</b>	196,1 $\pm$ 87,6 a	110,3 $\pm$ 56,6 b	61,3 $\pm$ 26,4 b	116,1 $\pm$ 31,3 b
	<b>CD3+/Campo</b>	11,5 $\pm$ 4,2 a	13,8 $\pm$ 2,6 a	10,0 $\pm$ 3,7 b	9,7 $\pm$ 3,5 b
<b>Jej</b>	<b>Vilo</b>	871,9 $\pm$ 209,4 a	773,5 $\pm$ 163,5 ab	899,7 $\pm$ 230,2 a	692,5 $\pm$ 137,6 b
	<b>Cripta</b>	97,3 $\pm$ 36,3	99,7 $\pm$ 35,0	110,18 $\pm$ 43,0	87,1 $\pm$ 37,3
	<b>Vilo/Cripta</b>	9,8 $\pm$ 3,6	8,4 $\pm$ 2,6	8,8 $\pm$ 3,2	9,0 $\pm$ 3,3
	<b>Caliciforme/Vilo</b>	129,2 $\pm$ 30,8 a	78,7 $\pm$ 38,4 b	79,5 $\pm$ 32,3 b	54,8 $\pm$ 15,6 c
	<b>CD3+/Campo</b>	2,9 $\pm$ 2,3 c	11,2 $\pm$ 4,8 b	11,6 $\pm$ 3,2 b	21,3 $\pm$ 5,5 a
<b>Íleo</b>	<b>Vilo</b>	798,15 $\pm$ 168,5 a	622,8 $\pm$ 157,0 b	476,4 $\pm$ 119,4 c	598,5 $\pm$ 134,0 b
	<b>Cripta</b>	97,9 $\pm$ 42,6	80,3 $\pm$ 40,0	75,0 $\pm$ 39,1	82,7 $\pm$ 34,2
	<b>Vilo/Cripta</b>	10,7 $\pm$ 8,4	10,8 $\pm$ 10,3	7,4 $\pm$ 2,6	8,0 $\pm$ 2,7
	<b>Caliciforme/Vilo</b>	92,3 $\pm$ 33,0	77,4 $\pm$ 38,0	67,0 $\pm$ 24,4	64,6 $\pm$ 28,9
	<b>CD3+/Campo</b>	14,2 $\pm$ 7,0 b	25,0 $\pm$ 8,5 a	11,4 $\pm$ 5,4 b	13,1 $\pm$ 3,6 b
<b>Ceco</b>	<b>Vilo</b>	322,3 $\pm$ 91,4 a	235,1 $\pm$ 38,0 b	274,7 $\pm$ 27,1 ab	303,9 $\pm$ 60,1 a
	<b>Cripta</b>	129,7 $\pm$ 60,9	117,6 $\pm$ 33,1	151,0 $\pm$ 23,4	131,0 $\pm$ 43,8
	<b>Vilo/Cripta</b>	3,0 $\pm$ 1,5 a	2,1 $\pm$ 0,5 b	1,8 $\pm$ 0,3 ab	2,5 $\pm$ 1,0 ab
	<b>Caliciforme/Vilo</b>	6,1 $\pm$ 2,7	9,0 $\pm$ 5,1	4,5 $\pm$ 2,7	6,0 $\pm$ 4,7
	<b>CD3+/Campo</b>	6,1 $\pm$ 2,7 b	4,8 $\pm$ 2,4 b	13,4 $\pm$ 3,3 a	5,8 $\pm$ 3,0 b

\*AO: ácido orgânico; Duo= duodeno, Jej= jejuno\*

\*\*Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05).

Com relação a variável profundidade de cripta não foram observados diferenças estatísticas entre os tratamentos em nenhum segmento intestinal.

Na variável vilo/cripta foi observado diferença estatística somente no ceco onde se obteve maior relação no grupo não inoculado com SM e menor relação no grupo inoculado com SM e não tratado. Os demais grupos apresentaram valores de relação vilo/cripta intermediários, porém semelhantes estatisticamente.

A variável contagem de células caliciformes somente em duodeno e jejuno foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos. Em duodeno o grupo não inoculado apresentou maior contagem de células caliciformes que os demais tratamentos. Em jejuno, o controle não inoculado com SM apresentou maior contagem de células caliciformes, em seguida, o controle inoculado com SM e não tratado e do grupo tratado com ácido na ração. O grupo inoculado e tratado com ácido orgânico na ração e na água apresentou contagem significativamente menor de células caliciformes em relação aos demais grupos.

Com relação aos dados de contagem de células CD3+ em duodeno, observou-se que os grupos inoculados e tratados com ácido orgânico na ração e na ração e na água apresentaram contagem significativamente menor que os demais grupos. Em jejuno, o controle não inoculado com SM (controle negativo) apresentou menor contagem de células CD3+ em relação aos demais tratamentos, e o grupo inoculado e tratado com ácido orgânico na ração e na água apresentou contagem significativamente maior de células CD3+ que os demais tratamentos. Em íleo observa-se que o controle positivo apresentou contagem significativamente maior de células CD3+ quando comparado aos demais grupos. E no ceco o grupo inoculado e tratado com ácido orgânico na ração apresentou contagem significativamente maior de células CD3+ em relação aos demais grupos.

### **Comparação das Análises Microbiológicas nos Experimentos 1 e 2**

A figura 1 ilustra a comparação entre a porcentagem de redução de SE e SM em papo e ceco de frangos, 7 dias após inoculação com *Salmonella*, nos diferentes tratamentos em relação ao grupo controle inoculado de cada experimento.

Pode-se observar redução de 60% da excreção de SE no papo de aves tratadas via ração ou via ração e água em relação ao grupo inoculado e não tratado,

não havendo diferença entre as vias de tratamento. Quando se compara a eficácia de redução de excreção de *Salmonella* no grupo inoculado com SM observa-se que os produtos adicionadas na ração ou na ração e na água reduziram no papo a contagem de SM em 34,3% e 47,4% respectivamente, quando comparado ao grupo inoculado e não tratado. Essa porcentagem de redução de *Salmonella* no papo com a utilização de ácidos orgânicos na ração ou ração e água é significativamente diferente entre grupos inoculados com SE e SM.

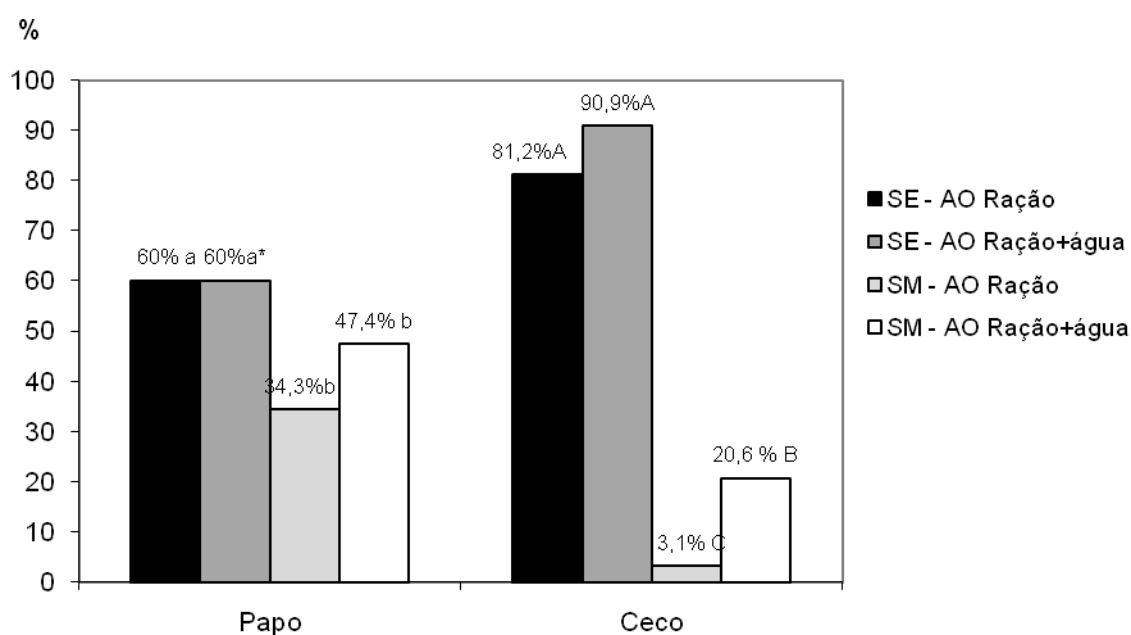


Figura 1 - Porcentagem (%) de redução de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Minnesota (SM) em relação ao grupo controle inoculado em papo e ceco de frangos 7 dias após inoculação nos diferentes tratamentos (AO = ácido orgânico). \*<sup>ab</sup> letras diferente entre colunas diferem significativamente ao teste de Qui-Quadrado a 5% de Probabilidade em papo. <sup>ABC</sup> Letras diferentes entre colunas diferem significativamente ao teste de Qui-Quadrado a 5% de probabilidade em ceco.

No ceco houve redução de 81,2% no isolamento de *Salmonella* no grupo inoculado com SE para o grupo tratado com ácido orgânico na ração e 90,9% para o grupo tratado com ácido orgânico na ração e na água, quando comparado ao grupo inoculado, não havendo diferença de porcentagem de redução da presença de *Salmonella* entre os grupos tratados com ácidos. Para os animais inoculados com SM a redução de isolamento de *Salmonella* no tratamento com ácido orgânico



somente na ração foi de 3,1%, significativamente menor que o grupo tratado com ácido orgânico na ração e na água cuja redução com relação ao grupo inoculado foi de 20,6%.

Quando se compara a eficácia de redução da presença de *Salmonella* no ceco entre grupos inoculados com SM e SE, verifica-se significativa diferença entre a eficácia de redução, onde o tratamento com ácidos orgânicos foram eficientes em animais inoculados com SE, mas não para SM, embora as condições em que os experimentos foram desenvolvidos tenham sido diferentes.

## **DISCUSSÃO**

Com relação a avaliação do desempenho zootécnico realizado no experimento 1, não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos. Estudos avaliando o desempenho zootécnico de frangos de corte e o uso de ácidos orgânicos apresentam resultados controversos, provavelmente devido aos diferentes mecanismos de ação, condições ambientais, dose e produto utilizado e parâmetros avaliados. Rezende et al. (2008) avaliaram diferentes níveis de inclusão de ácido acético em rações de frango experimentalmente contaminadas com *Salmonella* e observaram que a inclusão do ácido orgânico em todos os níveis avaliados melhorou os parâmetros zootécnicos dos animais, porém, no que se refere ao controle microbiológico, o uso do produto não foi satisfatório. Entretanto, estudos de Maiorka et al. (2004) não observaram diferenças significativas no ganho de peso na fase de 1 a 21 dias de idade de frangos tratados com uma mistura de ácidos fumárico (0,5%), láctico (5,13%), cítrico (5,4%) e ascórbico (1,2%) na ração. Vale et al. (2004) utilizando uma mistura de ácido fórmico e propiônico verificaram que a inclusão de até 1% na ração não altera o desempenho dos animais. Porém a inclusão de 2% desta mistura promoveu menor consumo de ração e de ganho de peso na fase

inicial (1-21 dias). Skinner et al. (1991), observaram que a inclusão de 0,125% de ácido fumárico na ração melhorou o ganho de peso de frangos aos 49 dias de idade e o consumo de ração foi maior quando incluiu-se 0,125 e 0,5% de ácido na dieta.

Com relação a inoculação dos animais, no primeiro experimento aos 7 dias pós-inoculação houve isolamento de *Salmonella* em papo e ceco mas não foi possível obter quantidade suficiente que permitisse a contagem deste microorganismo para nenhum dos tratamentos estudados, isso pode ter ocorrido devido a dose desafio que foi inoculada nas aves, a interação entre o parasita, hospedeiro e ambiente, onde no caso, a ave e/ou ambiente existente nestes sítios (pH, outros microorganismos, etc) pode ter diminuído a excreção dessa bactéria. Nas aves inoculadas com SE e não tratadas com ácidos orgânicos, foi possível observar no exame clínico diarreia e na necropsia enterite mucóide. No segundo experimento, optou-se por inocular as aves com uma concentração de  $10^8$  UFC/mL de SM devido a estudos prévios indicarem que com concentrações abaixo deste valor não possibilitaram excreção desta bactéria. No que se refere ao exame clínico e necropsia, aves inoculadas com SM não apresentaram sinais e lesões, podendo-se especular que a SM é menos patogênica do que SE para as aves.

Quando comparamos a porcentagem de redução de SE e SM proporcionada pelo tratamento com ácidos orgânicos em relação aos respectivos grupos inoculados e não tratados, observamos que tanto em papo quanto em ceco, o tratamento com ácido orgânico reduziu a porcentagem de animais positivos para SE, mais do que verificado quando se inoculou SM. A maioria da literatura tem comprovado que ácidos orgânicos são efetivos no controle de SE (Sterzo et al, 2007; Bassan et al, 2008), entretanto não existem estudos apresentando a eficácia destes contra SM. O mecanismo de ação dos ácidos orgânicos sobre *Salmonella* pode ser direto sobre

esta bactéria através da teoria dos ácidos fracos (Cherrington et al. 1991; Roth, 1998) ou por alteração da membrana celular como já mencionado por Stratford et al (2009) referindo-se ao ácido sórbico. Entretanto também sugere-se que os ácidos orgânicos podem reduzir a contagem de coliformes e aumentar bactérias lácticas na microbiota intestinal como observado por Pirgozliev et al (2008), e pelo mecanismo de exclusão competitiva diminuir a viabilidade da *Salmonella* (Pirgozliev et al, 2008).

A eficácia dos ácidos orgânicos de acordo com a via de administração do produto utilizado, também variou conforme o sorotipo inoculado. Para aves inoculadas com SE a adição do ácido orgânico na ração ou na ração e na água não mostrou diferença de eficácia na presença de *Salmonella* em papo e ceco. Já para SM a adição do produto na água, além do já existente via ração, aumentou a eficiência de ácidos orgânicos na redução da presença de *Salmonella* no ceco, porém o mesmo não foi observado em papo, sugerindo uma diferente interação da SM com o hospedeiro e a microbiota intestinal do que aquela observada com SE.

Um importante resultado deste trabalho refere-se a resposta do sistema imunológico das aves à inoculação de *Salmonella*. No primeiro experimento, utilizando citometria de fluxo, foi possível observar maior proporção de células CD4, CD28 e nos receptores de linfócitos de mucosa TCR  $\alpha\beta$  V $\beta$ 1 e TCR  $\alpha\beta$  V $\beta$ 2 no sangue das aves do grupo tratado com ácido orgânico na ração, quando comparado aos demais grupos. Esses resultados contrastam com menor número de células CD3+ e células caliciformes na mucosa intestinal do jejuno nas aves dos grupos tratados com ácidos orgânicos na ração e na ração e na água quando comparado ao controle. Asheg et al, (2003) também demonstraram redução no número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de galinhas infectadas com *Sallmonella* Enteritidis em comparação com o grupo controle não-infectado e sugerem que esse fenômeno

está relacionado a migração destas células para o sitio de ação da infecção com redução de sua expressão no sangue. Berndt et al. (2006) verificaram que aves vacinadas e submetidas a infecção com *Salmonella* Enteritidis, aumentaram a quantidade de células citotóxicas no ceco das aves indicando saída de células da circulação com destino ao tecido desafiado. Aves tem três diferentes receptores de linfócito T (TCR), TCR  $\gamma\delta$  (TCR1), TCR  $\alpha\beta$  V $\beta$ 1 (TCR2) e TCR  $\alpha\beta$  V $\beta$ 2. Neste trabalho, os dois últimos marcadores foram utilizados e observou-se diferenças significativas entre os grupos, compatível com menor proporção deste no sangue de aves desafiadas com SE e não tratadas com ácidos orgânicos. Cada célula individual expressa apenas um tipo de TCR em sua superfície, e os três tipos são capazes de estarem presentes tanto em células CD4 quanto CD8 (Berndt et al., 2006; Davidson et al., 1992; Sowder et al., 1988). Acredita-se que o TCR2 esteja envolvido na imunidade de mucosa, ao estimular a produção de IgA (Zecharias et al., 2002; Cihak et al., 1991).

CD28+ é um receptor de coestimulação da ativação de células T. Quando entra em contato com células apresentadoras de antígeno. A interação entre CD28 e B7 é essencial para a montagem da resposta imune (Linsley e Ledbetter, 1991). A redução na proporção de CD28+ circulante, como foi observada no grupo controle desafiado e não tratado no presente estudo, é visto na fase aguda de processos infecciosos devido ao destinamento dessas células para os órgãos linfóides secundários, em um processo conhecido como *homing* ou devido à excessiva ativação e conseqüente senescência das células, em um processo em que a molécula CD28 é perdida (Papagno et al., 2004; Nabeshima et al., 2002).

O Complexo de Histocompatibilidade Maior de classe I (MHC - I), conhecido em aves como o antígeno F, está presente em todos os linfócitos e eritrócitos de

galinhas (Hála et al., 1981). O MHC II, ou antígeno L, está presente na maioria dos linfócitos bursa-dependentes. Cerca de 10% dos linfócitos são positivos para MHC II, e desses, aparentemente cerca de 90% são linfócitos B (Hála et al., 1981). A marcação para MHC II também demonstra uma subpopulação que tem alta expressão dessas moléculas.

Com relação a morfologia intestinal, de acordo com Yamaiuchi e Isshiki (1991); quanto maior o número de células, maior o tamanho das vilosidades e conseqüentemente maior a área de absorção dos nutrientes. Para relação vilosidade/cripta intestinal é desejável que as vilosidades apresentem-se altas e as criptas rasas (Nabburs, 1995). De acordo com Hancock (1990) a profundidade da cripta é indicativo do nível de hiperplasia das células intestinais; sendo que a redução da profundidade indica menor nível de agressão a morfologia da parede intestinal. Com relação a altura de vilosidade, Maiorka et al., (2004), cita que ácidos orgânicos, aminoácidos e prebióticos estimulam o desenvolvimento da mucosa intestinal causando aumento do número de células e conseqüentemente aumento do tamanho das vilosidades. Samanta et al. 2009, observaram que a suplementação de mistura de ácidos orgânicos na dieta de frangos aumentou o tamanho das vilosidades em duodeno, jejuno e íleo dos animais. Esta relação pode ser confirmada em experimentos sem desafio, porém, verifica-se hoje em experimentos com animais desafiados, que tão importante quanto a altura da vilosidade é o conhecimento do tipo celular presente nessa vilosidade, como observado neste experimento. As células caliciformes são as células produtoras de glicoproteínas (muco) que tem as funções de proteção da mucosa intestinal contra agentes abrasivos da dieta e agentes patogênicos e também participa na absorção dos nutrientes. O muco participa da resposta imune inespecífica, e quando há grande

expressão de células caliciformes significa que pode haver algum tipo de desafio sanitário que demande maior produção de muco. Em contrapartida, o muco quando em grandes quantidades pode trazer prejuízos para a saúde da ave, pois aumenta o trânsito intestinal, reduzindo a absorção dos nutrientes. Já as células CD3+ são linfócitos T, que participam da resposta imune específica do animal.

No presente estudo, com relação aos tipos celulares, na mucosa do jejuno, o grupo controle inoculado com SE apresentou maiores quantidades de células caliciformes e de células CD3+ comparado aos grupos tratados com ácidos orgânicos, isso pode indicar que, por estes ácidos orgânicos controlarem a infecção por SE, visto pela redução do isolamento, diminui a necessidade de expressão de células caliciformes e menor ativação de células CD3+ na mucosa.

No caso específico da inoculação com SE, verifica-se uma resposta clássica de desafio e resposta do hospedeiro, ou seja, o grupo inoculado apresentou maior excreção de *Salmonella*, maior número de células CD3+ na mucosa intestinal e diminuição na proporção de marcadores de células imunológicas no sangue dos animais. O controle de *Salmonella* demonstrado pelos ácidos na análise microbiológica culminou com resposta imunológica menos intensa da ave (menor presença de células CD3+ e maior proporção de marcadores de células imunológicas no sangue dos animais). Já no segundo experimento, na análise microbiológica não se verifica, no ceco, diminuição da excreção de *Salmonella* em aves inoculadas e tratadas com ácidos orgânicos. Os resultados da morfometria também são bastante contraditórios entre os grupos inoculados com SM e tratados com ácidos orgânicos. Entretanto quando compara-se o controle inoculado com o controle negativo não inoculado, observa-se que o primeiro grupo (inoculado) apresenta menor proporção de células caliciformes e maior proporção de células

CD3+ na mucosa do duodeno, jejuno e íleo quando comparado ao grupo não inoculado. Isso demonstra uma resposta do hospedeiro frente a inoculação em todos esses segmentos, mas não deixa claro qual a interação da SM com a microbiota intestinal e com a saúde destas aves, já que não são observados sinais clínicos e tampouco lesões intestinais. Acredita-se que maiores estudos são necessários para se compreender melhor esta interação entre SM e hospedeiro.

## CONCLUSÃO

Nas condições em que foram conduzidos os dois experimentos observa-se que na avaliação microbiológica, os ácidos orgânicos reduzem significativamente a excreção de SE em papo e ceco de frangos, independente da via de administração, porém são pouco efetivos no controle de SM.

Com relação a avaliação imunológica, observa-se que a diminuição no isolamento de *Salmonella*, observado no grupo inoculado com SE e tratado com ácido orgânico na ração está correlacionado com maiores proporções de células com marcadores CD4 e CD8, TCR no sangue e menores proporções de células CD3+ na mucosa intestinal das aves.

Para SM foi observado uma reação imunológica a inoculação, demonstrado pelo maior número de células caliciformes e menor número de células CD3+ na mucosa intestinal dos animais não inoculados e uma relação inversa nos animais inoculados com SM, porém mais estudos são necessários para a compreensão da interação entre SM e hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

ASHEG, A.A.; LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; SEVCIKOVA, Z.; KOLODZIEYSKI, L.; PISTL, J. Dynamics of lymphocyte subpopulations in immune organs of chicken infected with *Salmonella* Enteritidis. **Acta Veterinaria Brno**, v.72, p.359-364, 2003.

BASSAN, J.D.; FLÔRES, M.L.; ANTONIAZZI, T.; BIANCHI, E.; KUTTEL, J.; TRINDADE, M.M. Controle da infecção por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. **Ciência Rural**, v.38, n.7, 2008.

BERNDT, A.; PIEPER, J.; METHNER, U. Circulating  $\delta\gamma$  T cells in response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, n.7, v.74, p.3967-3978, 2006.

BOPP, C.A.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALTER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM press, 2003. Cap.28, p.459–474.

BRASIL. 2003. MAPA, Instrução Normativa nº6 publicada em 26 de agosto de 2003.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003.

CENTER OF DISEASE CONTROL. *Salmonella* Surveillance: **Annual Summary**, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of health and Human Services, CDC, 101p. 2008.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Organic Acids: Chemistry antibacterial activity and practical application. **Advances in Microbiological Phisiology**, v. 32, p.87-108, 1991.

CIHAK, J.; LÖSCH, U.; HOFFMANN-FEZER, G.; CHEN, C.H.; COOPER, M.D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L. *In vivo* depletion of chicken T-cell subsets. **Scandinavian Journal of Immunology**, n. 38, p.123-129, 1991.

DAVIDSON, N.J.; CHEN, C.H.; BOYD, R.L. Kinetics of chicken embryonic thymocyte development *in ovo* and *in organ* culture. **European Journal of Immunology**, n. 6, v.22, p.1429-1435, 1992.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Serological and Bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**. v.60, p.259-269, 1998.

FAIR, J.M.; TAYLOR-MCCABE, K.J.; SHOU, Y.; MARRONE, B.L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 125, p. 268-273, 2008.

HÁLA, K. BOYD, R.; WICK, G. Chicken major histocompatibility complex and disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.14, p.607-616, 1981.

HANCOCK, J.D.; PEO, E.R.J.R.; LEWIS, A.J. Effects of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. **Journal of Animal Science**, v.68, p.3244-3251, 1990.

HERES, L.; ENGEL, B.; URLINGS, H.A.P; WAGENAAR, J.A.; VAN KNAPEN, F. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, n. 99, p. 259–267, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.A.; COX, M.M. Principles of Biochemistry. New York. **Worth Publishers**, 576p.; 1993.



LINSLEY, P.S.; LEDBETTER, J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual Review of Immunology**, n.11, p.191-212, 1993.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; BORGES, S. A.; OPALINSKI, M.; SILVA, A. V. F. Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascórbico em dietas iniciais de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 31-37, 2004.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SILVA, A.V.F.; BRUNO, L.D.G.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento do Trato Gastrointestinal de Embriões Oriundos de Matrizes Pesadas de 30 e 60 Semanas de Idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.2, p.141-148, 2000.

NABESHIMA, S.; MURATA, M.; KIKUCHI, K.; IKEMATSU, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. A. Reduction in the number of peripheral CD28+CD8+ T cells in the acute phase of influenza. **Clinical & Experimental Immunology**, n.128, p.339-356, 2002.

NABUURS, M.J.A. Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning. **Pig News and Information**, v. 16, n.3, p.93-97, 1995.

NATIONAL RESEARCH CONCIL - NRC. **Nutrient requirements of poultry**. 9<sup>th</sup> rev.ed. National Academy Press: Washington, D.C. 1994.

PAPAGNO, L.; SPINA, C.A.; MARCHANT, A.; SALIO, M.; RUFER, N.; LITTLE, S.; DONG, T.; CHESNEY, G.; WATERS, A.; EASTERBROOK, P.; DUNBAR, P.R.; SHEPERD, D.; CERUNDOLO, V.; EMERY, V.; GRIFFITHS, P.; CONLON, C.; MCMICHAEL, A.J.; RICHMAN, D.D.; ROWLAND-JONES, S.L.; APPAY, V. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. **PLOS Biology**, n. 2, p.173-185. 2004.

PIRGOZLIEV, V.; MURPHY, T.C.; OWENS, B.; GEORGE, J.; MCCANN, M.E.E. Fumaric and sorbic acid as additives in broiler feed. **Research in Veterinary Science**, n. 84, p. 387–394, 2008.

REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J. ; ANDRADE, M. A.; STRINGHINI, J. H.; CHAVES, L. S.; MINAFRA, C. S.; LAGE, M.E. Ácido acético em rações de frangos de corte experimentalmente contaminadas com *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p. 516-528, 2008.

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Organic acids as feed additives for Young pigs: nutritional and gastrointestinal effects. **Journal of Animal and Feed Science**, n. 8, p. 25-33, 1998.

RUSSEL, J. B. Another Explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.363-370, 1992.

SAMANTA, S.; HALDAR, S.; GHOSH, T.K. Comparative Efficacy of an Organic Acid Blend and Bacitracin Methylene Disalicylate as Growth Promoters in Broiler Chickens: Effects on Performance, Gut Histology, and Small Intestinal. **Veterinary Medicine International**, 8p., 2009.

SKINNER, J.T.; IZAT, A.L.; WALDROUP, P.W. Research note: fumaric acid enhances performance of broiler chickens. **Poultry Science**, n. 70, v.6 ,p.1444 - 1447, 1991.

SOLOMONS,G.; FRYHLE,C. Química Orgânica, 7 ed.. Rio de Janeiro: **LTC Livros Técnicos e Científicos**, v.1 e 2, 2002.

SOWDER, J.T.; CHEN, C.H.; AGER, L.L.; CHAN, M.M.; COOPER, M. D. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian  $T\gamma/\delta$  receptor. **Journal of Experimental Medicine**, v.167, p.315-322, 1988.

STERZO, E.V.; PAIVA, J.B.; MESQUITA, A.L.; FREITAS NETO, O.C.; BERCHIERI, Jr A. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella entérica* serovar Enteritidis experimental infection in chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n.1 p. 69 – 73, 2007.

STRATFORD,M.; PLUMRIDGE,A.; NEBE-VON-CARON, G.; ARCHER,D.B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 37-43, 2009.

VALE, M.M.; MENTEN, J.F.M.; MORAIS, S.C.D.; BRAINER, M.M.A. Mixture of formic and propionic acid as additives in broilers feeds. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 371-375, 2004.

YAMAUCHI,K.E.; ISSHIKI, Y. Scanning electron microscopic observations on the intestinal villi in growing White Leghorns and broiler chicken from 1 to 30 days of age. **British Poultry Science**, v.32, p.67-78, 1991.

ZUCKERMANN, F. A. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.1-2, v.72, p.55-56, 1999.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ácidos orgânicos podem ser utilizados no controle da microbiota intestinal, porém seus efeitos dependem não só do tipo e da inclusão, mas também do ambiente onde vivem os animais, sendo seu uso mais indicado em ambientes com maior desafio sanitário.

O uso dos ácidos orgânicos também pode ser indicado no controle da *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte pois reduz a excreção desta bactéria em papo e em ceco de frangos, 7 dias após o desafio, porém os ácidos orgânicos não mostraram-se tão eficazes em reduzir *Salmonella* Minnesota, provavelmente devido as diferentes condições em que o experimento foi desenvolvido e dose-desafio utilizada. Com relação a via de administração, a adição de ácidos orgânicos na água de bebida de frangos não mostrou maiores reduções na excreção de SE em papo e ceco, quando comparado ao grupo somente com ácido orgânico na ração.

A resposta imunológica contra SE pelo hospedeiro se reflete em diminuição da proporção de marcadores de células imunológicas no sangue dos animais e aumento das células CD3+ na mucosa intestinal, reação essa que é controlada pelo uso de ácidos orgânicos, provavelmente por atuarem sobre a SE.

Para aves inoculadas com SM foi observada reação imunológica a inoculação com maior número de células calciformes e menor número de células CD3+ nos animais não inoculados e uma relação inversa nos animais inoculados com SM, porém mais estudos são necessários para a compreensão da interação entre SM e hospedeiro.