

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO SCHERER SIMÕES

USO DE PROBIÓTICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM FRANGOS DE CORTE
DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERICA* SOROVAR HEIDELBERG



PALOTINA-PR

2014

RICARDO SCHERER SIMÕES

USO DE PROBIÓTICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM FRANGOS DE CORTE
DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERICA* SOROVAR HEIDELBERG

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa de Patologia Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Edna Tereza de Lima

PALOTINA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S593 Simões, Ricardo Scherer
Uso de probióticos e ácidos orgânicos em frangos de corte
desafiados com *Salmonella enterica* sorovar heidelberg;
Orientador, Edna Tereza de Lima.
- Palotina, PR, 2015.
57p.

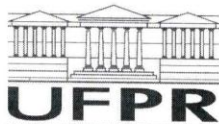
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, PR -- Área de Concentração:
Produção Animal. c Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, 2015.

1. Ácidos orgânicos 2. Aves de corte. 3. *Salmonella*.
I. Edna Tereza de Lima. II. Universidade Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título

CDU 579.67

Ficha catalográfica elaborada por Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

RICARDO SCHERER SIMÕES

USO DE PROBIÓTICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM FRANGOS DE CORTE
DESAFIADOS COM *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Professora Dr^a. Edna Tereza de Lima

Presidente/Orientador(a): Universidade Federal do Paraná

Professora Dr^a. Cláudia Yurika Tamehiro

Membro: Universidade Federal do Paraná

Professora Dr^a. Jovanna Inês Müller Fernandes

Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 16 de outubro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ricardo Scherer Simões, filho de Roni Scherer Simões e Teresinha Scherer Simões, nascido em São Sepé – RS no dia 07 de julho de 1980. Concluiu o ensino fundamental (1994), e médio em colégio estadual do município de São Sepé-RS (1997), concluiu curso de Artíficie Industrial no Colégio Técnico Industrial de Santa Maria-RS (1999). Ingressou na Universidade Federal de Santa Maria (2000). Bolsista da PRAE da UFSM no setor de piscicultura do departamento de zootecnia do ano de (2002-2005). Formado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria-RS (2005). Admitido pela CVale-Cooperativa Agroindustrial no ano de 2006 onde atua no fomento avícola até a presente data. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná-setor Palotina, no ano de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado a minha vida, aos meus pais Roni e Terezinha Simões que sempre me apoiaram e fizeram ao máximo para que não desistisse dos estudos.

Agradeço aos meus irmãos Núbia e Ronei Simões que nunca negaram os pedidos de ajuda.

A minha orientadora professora Edna Tereza de Lima por ter acreditado em mim, pela paciência e auxílio nas tarefas e também a todos da coordenação do Programa de Pós-Graduação em ciência animal.

Agradeço a Anorita pela grande dedicação ao preparo dos materiais.

A todos os graduandos (Tatiane, Débora e Flávia) que me ajudaram nas análises microbiológicas e a professora Aline Viott.

A Estela Koba e ao Wiliam Miguel que mesmo longe e com seus compromissos, dedicou o seu tempo para realizar as análises estatísticas do trabalho.

A professora Jovanir Müller Fernandes pela sua grande colaboração e auxílio que prestastes a mim para conclusão dos trabalhos.

Agradeço a minha querida esposa Francieli Rangel e minha filha Laura Simões que sempre me apoiaram.

A empresa Btech e seus colaboradores pelo apoio para realização deste estudo.

A C.Vale-cooperativa agroindustrial em especial aos seus funcionários Jânio Argenta e Leonel Molin.

Ao laboratório Mercolab que disponibilizou os inóculos utilizadas nesse trabalho.

SIMÕES, R. S. **Uso de probióticos e ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg**. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Paraná, Palotina. 2014.

RESUMO

O objetivo do estudo foi de avaliar o uso de probióticos e ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH). Foram avaliados contagem bacteriana nos ingluvíos e cecos, índice de positividade das aves, morfometria intestinal aos 22 dias de idade e peso das aves semanalmente. Foram alojados 300 pintos de corte de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb, distribuídos em 5 tratamentos de 60 aves e 4 repetições de 15 aves cada. No tratamento 1 (controle negativo); tratamento 2 (controle positivo-desafio); tratamento 3 (desafio e probióticos); tratamento 4 (desafio e ácidos orgânicos) e tratamento 5 (desafio e probióticos + ácidos orgânicos). Foram realizados procedimentos microbiológicos para isolamento de SH em suabes de cloaca e fígados, e também contagem bacteriana dos ingluvíos e cecos. Os resultados obtidos das análises de fígados foram todos negativos para o controle negativo, já nos demais tratamentos e grupo controle positivo, demonstraram índices percentuais de positividade. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos e grupo controle positivo. Nas análises de suabes de cloaca ocorreu um maior percentual significativo de negativos no tratamento com probióticos em relação aos demais tratamentos. Nas médias de pesos avaliados não houve diferença significativa entre os tratamentos e grupos controles, nas avaliações do dia 22. Em relação ao comprimento de vilosidades e profundidades das criptas intestinais não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e grupos controles, já para a relação vilo e cripta houve maior razão vilo:cripta no controle positivo em relação ao controle negativo. Todos os tratamentos e grupo controle positivo demonstraram contagem bacteriana de SH nos cecos e ingluvíos, sendo que o controle negativo não obteve contagem. Nos cecos não houve diferença significativa ($p > 0,05$), entre a contagem bacteriana de SH nos tratamentos e controle positivo, já na contagem de SH nos ingluvíos, houve menor contagem no tratamento com probióticos (T 3), já nos demais tratamentos não houve diferenças. Estes resultados poderiam ser diferentes se houvesse maior tempo de tratamento após a inoculação (desafio). Com base nos resultados obtidos o uso dos probióticos podem reduzir a contagem bacteriana de SH no ingluvío, entretanto no ceco não foram observados efeitos significativos dos mesmos. As alternativas como os probióticos podem ser úteis para controle de *Salmonella* spp. para produção avícola.

Palavras-Chave: *Salmonella*, probióticos, ácidos orgânicos, aves de corte

SIMÕES, R. S. **Use of probiotics and organics acids in broiler chickens challenged with *Salmonella enterica serovar Heidelberg***. 2014. 56f. Dissertation (Master's degree in Animal Science) - University Federal of Paraná, Palotina. 2014.

ABSTRACT

The aim of trial was evaluate to the use of probiotic and organics acids in broiler chickens challenged with *Salmonella enterica sorovar Heidelberg*. It was evaluated the bacterials count in caecum and crops, index of positive chickens, gut morphometry e weigth of chickens weekly. It was housing three hundred broiler chickens with one day of age, lineage cobb. The chickens was distributed in five treatments with sixty hundread chickens each when four repetitions of fifteen chickens each. In treatment one(negative control), treatment two(positive control with *Salmonella Heidelberg*), treatment three(probiotics and *Salmonella Heidelberg*),treatments four(organics acids and *Salmonella Heidelberg*), treatments five(probiotics, organics acids and *Salmonella Heidelberg*).It was realized procedures of bacterial isolation.in liver and cloaca's swab and also countage of SH in caecum and crop. The results of liver showed that all the samples of liver and cloaca's swab were negatives of control negative. In the positive control and other treatments was isolated SH, however didn't have significative differences in the treatments and the positive control. The samples of swabs cloaca had highest percentage of samples negative of treatment with probiotic relationship with the other treatments and group controls. The average of weigth evaluated in the treatments e controls groups didn't have significative difference in the 22 days. The length of villo and depth of crypta didn't have significative differences($p>0,05$), but occurred significative differences in the reason villo:crypta between the negative control and positive control, therefore the positive control with biggest reason. In all the treatments and positive group occurred count of SH in the ceco and crops, but don't in the negative control. Only in the crops occurred lower count than the count of SH in the treatment 3(probiotics and SH) in the others treatments didn't have significative differences. If the time after inoculation was great maybe we will get other results Through of results obtained in this study conclude that the use of probiotics can reduce the count of *Salmonella Heidelberg* in crops but didn't reduce the count in the ceca significantly. The alternatives as the probiotics can be helpful to reduce *Salmonella*.

Key words: *Salmonella*, probiotics, organic acids, broiler chickens

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micro-organismos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos.....	19
Tabela 2 - Contagem de colônias de SH em log ₁₀ /mL no Inglúvio de aves desafiadas com SH e tratamentos nas diferentes idades após inoculação	36
Tabela 3 - Contagem de colônias de SH em log ₁₀ /ml no ceco de aves desafiadas com SH e tratamentos nas diferentes idades após inoculação	37
Tabela 4 - Comprimento do vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 22 dias de idade	39
Tabela 5 - Peso médio(g) nas idades de 0, 8, 15 e 22 dias e tratamentos	41
Tabela 6 - Detecção de <i>Salmonella</i> Heidelberg nos fígados de aves, por isolamento bacteriano nos diferentes tratamentos. Resultados expressos em percentual de fígados contaminados e não contaminados.	43
Tabela 7 - Índice de aves infectadas (fígados) por <i>Salmonella</i> Heidelberg aos diferentes tratamentos. Resultados expressos em percentual de fígados contaminados.....	44
Tabela 8 - Detecção de SH nos suabes de cloaca por isolamento bacteriano nos diferentes tratamentos. Resultados expressos em percentual de suabes contaminados e não contaminados.....	44
Tabela 9 - Índice de aves infectadas (suabe de cloaca) por <i>Salmonella</i> Heidelberg aos diferentes tratamentos e idades. Resultados expressos em percentual de suabes contaminados.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sala contendo as gaiolas com os grupos controle e tratamentos32

Figura 2 - Placa com colônias de *Salmonella* Heidelberg em ágar verde brilhante...35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>Salmonella</i> Spp.	15
2.2 Probióticos.....	21
2.3 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24
2.4 Ácidos Orgânicos	25
2.5 Objetivos Gerais	28
2.6 Objetivos Específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Local.....	29
3.2 Aves.....	29
3.3 Delineamento Experimental	30
3.4 Descrição dos Tratamentos.....	30
3.5 Ambiente	31
3.6 Amostras de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Heidelberg.....	32
3.7 Inóculo de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Heidelberg (SH)	32
3.8 Cultivo Microbiológico	33
3.8.1 Fígado	33
3.8.2 Suabe cloacal	34
3.8.3 Cecos e Inglúvios	34
3.9 Morfometria das vilosidades e criptas intestinais	35
3.10 Análise Estatística	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Contagem bacteriana-Inglúvio.....	36

4.2 Contagem bacteriana-cecos.....	37
4.3 Medidas do comprimento das vilosidades, profundidade das criptas intestinais e relação vilo:cripta	39
4.4 Avaliação das pesagens das aves	41
4.5 Avaliação da capacidade de proteção dos tratamentos e desafio de SH	42
4.5.1 Índice de aves infectadas (fígados)	42
4.5.2 Índice de aves infectadas (suabe de cloaca).....	44
5 CONCLUSÕES	46
6 REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Segundo UBABEF (2014), o Brasil ocupa a primeira colocação em volume de exportação mundial de carne de frango, com um total de 3.918 mil toneladas no ano de 2013, seguidos por Estados Unidos e União Européia. Essa posição privilegiada em relação a produtividade de carne de aves é resultado de uma maior diversificação das atividades das propriedades rurais, o que pode se traduzir em maior rendimento econômico e desenvolvimento social tanto das pessoas que trabalham na agricultura quanto naquelas que vivem nas cidades.

No Brasil a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente e responde por quase 1,5 % do produto interno bruto (PIB) nacional (UBABEF, 2014). Segundo Macari e Furlan (2005), na avicultura de corte moderna o que se busca, através de novas técnicas de manejo, uso de tecnologia, controle sanitário e constante melhoramento genético é a redução nos custos de produção e o aumento da produtividade, portanto por vários anos o setor avícola lançou mão de algumas ferramentas que foram responsáveis pelo maior crescimento e rendimento dos animais, dentre elas os chamados aditivos melhoradores de desempenho.

A presença de *Salmonella spp.* é uma condição constante, que exige por parte das indústrias, adoção de procedimentos preventivos, necessitando de constantes ações para seu controle em todas as fases de produção avícola (RODRIGUES, 2005).

Na avicultura, mesmo nas granjas mais tecnificadas, um dos problemas sanitários mais temidos, é sem dúvida o surgimento de uma salmonelose via *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Thyphimurium* ou *Salmonella Enteritidis*, devido aos enormes riscos através da carne e ovos aos humanos (BERCHIERI, 2000).

Dentre as bactérias, as do gênero *Salmonella*, representam maior importância na avicultura devido ao risco de contaminação alimentar em seres humanos (CHERNAK et al., 2002).

Estima-se que os alimentos consumidos nos Estados Unidos foram contaminados por com 31 agentes conhecidos de doenças alimentares, o que causou 9,4 milhões de pessoas afetadas, 55.961 hospitalizações e 1.351 mortes a cada ano no período de 2000 a 2008, entre os agentes envolvidos encontram-se

Salmonellas paratíficas, *Norovírus*, *Campylobacter spp.* e *Toxoplasma gondii* que causaram hospitalizações e mortes (SCALLAN et al., 2011).

Os custos estimados da alta incidência da salmonelose nos Estados Unidos variaram entre 1,3 a 4,0 bilhões de dólares por ano em decorrência de despesas médicas, ausência ao trabalho e quebras de produtividade (TAITT; SHUBIN; ANGEL, 2004).

Salienta-se que *Salmonella Spp.* é um dos mais importantes agentes patogênicos de interesse em saúde pública em um trabalho conduzido por (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006), em 1978 a 2000 no estado do Paraná, verificaram que em doenças transmitidas por alimentos a *Salmonella Spp.* estava presente em 33,8% dos surtos deste período.

Salmonella Spp. está amplamente distribuída na natureza e é, primariamente, um patógeno de aves domésticas, bovinos, suínos, pássaros, ovinos, focas, macacos, lagartos e outros répteis (KONEMAN et al., 1997).

A presença da *Salmonella* em alimentos é um relevante problema de saúde pública que não deve ser tolerado em países desenvolvidos, e principalmente em países em desenvolvimento, porque os sinais e sintomas podem ser mal diagnosticados sobrecarregando ainda mais todo o sistema de saúde (FLOWERES, 1988).

A presença de *Salmonella* na pele, penas, pés, cloaca e trato digestivo das aves é um fator agravante para a indústria avícola e de processamento de carne, pois o patógeno pode ser transferido para carcaças de frango dentro do abatedouro, ainda no processamento, e transformar-se em um risco para a saúde pública comprometendo a segurança alimentar da população (REZENDE et al., 2005).

A *Salmonella* Heidelberg (SH) tem obtido importância na América do Norte, e encontradas em carnes de aves em outros países. Esta também tem sido isolada e reportada em produtos avícolas no Brasil desde 1962 (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997).

Salmonella enterica sorovar Heidelberg é citada como o terceiro isolado mais frequente na avicultura do Canadá e o quarto em doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos (CHITTICK et al., 2006).

Em estudos epidemiológicos, laboratoriais, investigações realizados por local, estado indicam que o consumo de carne de frango provindos de granjas produtoras

foi a fonte de contaminação de surtos de toxiinfecções por *Salmonella* Heidelberg (CDC, 2014).

A *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg é uma das cinco principais salmonelas associadas a toxinfecção em seres humanos e uma das mais comumente isoladas em galinhas, perus e suínos (FOLEY e LYNNE, 2008).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos em frangos de corte poderão resultar no desenvolvimento de populações bacterianas com possível resistência, dificultando assim o seu uso (FULLER, 1989).

Em um estudo realizado por Santos (2000), analisando amostras de *Salmonella* Spp. isoladas de carcaças de frangos congeladas e comercializadas em Jaboticabal, São Paulo, constatou que as cepas foram 100% resistentes à ampicilina, 75% à cefalotina, 52,10% à cefoxitina, 22,90% à tobramicina, 6,20% à polimixina B e a tetraciclina, 4,20% à gentamicina e 2,10% à netilmicina, aztreonam e à amicacina.

Os ingredientes de origem microbiana como os probióticos e prebióticos tem merecido especial atenção como alternativa ao uso dos tradicionais antibióticos, embora haja necessidade de mais pesquisas, a utilização de prebióticos e probióticos representa um avanço tecnológico, aplicando os efeitos benéficos propiciados pela natureza às criações industriais (MACARI; FURLAN, 2005).

Os probióticos que se referem a um grupo de microorganismos que tem potencial em reduzir a população de bactérias patogênicas estão ganhando cada vez mais importância nos setores de produção avícola e suinícola com base em estudos realizados, que alguns defendem a teoria da exclusão competitiva e outros que não tiveram resultados positivos mas que ao longo do tempo pelas poucas alternativas que se tem atualmente fazem o uso destes produtos.

A utilização de probióticos e prebióticos, na dieta de frangos podem significar uma alternativa viável na avicultura de corte, sendo que em um estudo realizado com probióticos, prebióticos e simbióticos, não foram observadas diferenças significativas no desempenho das aves quando comparadas ao grupo tratado com antibióticos (MAIORKA et al., 2001).

Os probióticos necessitam de resistência aos intempereis do meio ambiente e também após o processamento das rações, a qual recebem tratamento térmico em etapas da produção, isto pode ser atribuído ao grupo de bactérias do gênero *Bacillus*, devido a formação de esporos.

Para auxiliar na prevenção e minimizar as infecções por bactérias patogênicas são adicionados ácidos orgânicos á dieta, pois estes alteram o pH , passando a ter uma ação antibacteriana, particularmente contra bactérias Gram negativas(OSTERMANN et al., 2005).

O presente estudo teve por objetivo, avaliar o uso de probióticos e ácidos orgânicos no controle de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg em frangos de corte, bem como a morfometria intestinal e peso das aves após inoculação experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* Spp.

O gênero *Salmonella*, foi nomeado pelo USDA veterinário bacteriologista Daniel e Salmon (1850-1914), e consiste em mais de 2.400 variantes sorologicamente distintas, sendo que os sorotipos são nomeados de acordo com o local onde são isolados inicialmente (GAST, 2003).

Há apenas duas espécies de *Salmonella*, *S. enterica* e *S. bongori*, que são divididas em oito grupos (BOYD et al., 1996). Existem mais de 2.400 sorotipos (ou sorovares) e eles agora são utilizados como base para a nomenclatura de *Salmonella*, embora todos os sorovares possam ser considerados patógenos, somente cerca de 200 têm sido associados com doenças em humanos (FORSYTHE, 2013).

Algumas espécies são divididas em tipos sorológicos denominados sorovares de acordo com a especificidade antigênica, que é caracterizada por antígenos somáticos "O" e capsulares "K" que são denominados "v i" em *Samonella* Typhi e antígenos flagelares "H" (EWING, 1986).

Os sorotipos dentro de um grupo possuem em determinante antigênico comum "O". Existem grupos adicionais, porém a maioria dos isolados clínicos de humanos e animais estão encontrados nos grupos de A e O (CARTER, 1988).

Salmonella Spp., são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas , não formam endósporos e tem forma de bastonetes curtos (1 a 2 micrômetros),

sendo que a maioria das espécies são móveis e possuem flagelos peritríquios, apenas a *S. Gallinarum* e *S. Pullurom* não são móveis (FORSYTHE, 2013).

Estes compreendem bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, anaeróbicos facultativos. O micro-organismo apresenta crescimento ótimo à 37 °C e produz gás a partir da glicose (exceto *S. Typhi*), sendo capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono (FRANCO; LANDGRAF, 1996). *Salmonellas* são capazes de fermentar carboidratos e produzir gases e ácidos, as *Salmonellas* produzem H₂S, não produzem a enzima oxidase e são capazes de produzir a enzima catalase (RUSSEL, 2012).

Segundo Juneja et al. (2009), a temperatura máxima de crescimento da *Salmonella* é de 46,96°C, desta maneira a salmonella cresce bem em intestinos de humanos e espécies de aves (RUSSEL, 2012).

As *Salmonellas* são inativadas pelo calor a 55°C por 1 hora ou 60°C por 15 a 20 minutos. A resistência a antibióticos começou a ser observada em 1958 por Huey e Edwards, que estudaram amostras de *Salmonella* resistentes as tetraciclina. Logo após, em 1962, cepas de *Salmonella* Typhimurium mostraram-se resistentes a ampicilina, estreptomicina e sulfonamidas (GAST, 1997; HOLT et al., 1994).

Em geral a susceptibilidade de *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum pode ser comparada a outros membros paratíficos. Eles podem sobreviver por muitos anos em um ambiente favorável, mas eles são menos resistentes aos grupos paratíficos ao calor, agentes químicos e fatores ambientais adversos (GAST, 2003).

As salmonelas paratíficas são recuperadas de uma grande variedade de materiais: cama, pó, alimento, fezes, intestino, órgãos, mecônio, carcaças, suaves de superfície e outros, porém as tíficas (SG e SP), são isoladas fundamentalmente de órgãos de aves (fígado, coração, baço e ovário) (BACK, 2014).

Salmonella Spp. está amplamente distribuída na natureza e é, primariamente, um patógeno de aves domésticas, bovinos, suínos, pássaros, ovinos, focas, macacos, lagartos e outros répteis (KONEMAN et al., 1997).

A complexa epidemiologia da *Salmonella* na cadeia de produção de aves envolve a transmissão vertical, via ovo, desencadeando o nascimento de pintos infectados. Envolve, também, a transmissão horizontal, com a contaminação do ambiente e de ração, além da existência de diferentes espécies animais que constituem reservatórios da bactéria. A prevenção e controle da *S. Enteritidis* (SE)

constitui uma tarefa árdua, mas extremamente necessária. As medidas mais utilizadas para a redução da bactéria nas aves e no ambiente de criação constituem-se em: biossegurança, aquisição de aves, rações e matérias-primas livres de *Salmonella*, uso de ácidos orgânicos e peletização das rações, administração de produtos de exclusão competitiva e imunização com vacinas vivas ou inativadas oleosas (bacterinas) (STERZO; VARZONE; FERRARI, 2008).

Segundo Amson, Haracemi e Masson (2006) no período de 1987 a 2006, no estado do Paraná, verificou-se que em doenças transmitidas por alimentos a *Salmonella* Spp. estava presente em 33,8% dos surtos, números apenas inferiores aos registrados por *Staphilococcus aureus* que representou 41,2% dos casos.

A *Salmonella* também em sido isolada de muitos tipos de frutas e vegetais crus, incluindo brotos de feijão, melões, sucos de laranja não pasteurizado, suco de maçã e tomates (BIDOL et al., 2007).

O sorotipo predominante causador de infecções mudou nas últimas décadas de *S. Agona*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium* para *S. Enteritidis*, sendo este sorotipo a causa predominante das salmoneloses em diversos países (SILVA; DUARTE, 2002).

Rezende et al. (2005), avaliando a frequência de isolamento de diferentes sorovares de *Salmonella* em carcaças de frangos abatidos no estado de Goiás, Brasil, identificou que 63,1% das amostras foram isoladas SE, sendo que a maior percentual de resistência foi dada ao antimicrobiano tetraciclina.

De acordo com pesquisas canadenses foi verificado que *S. Hadar* e *S. Heidelberg* tem sido as cepas mais encontradas em frangos de corte, e *S. Heidelberg* e *Thyphimurium* em ovos incubados (CHAMBERS,1997; POPPE;DUNCAN; MAZZOCO, 1998).

No Brasil, desde 1962, a *Salmonella* Heidelberg tem sido identificada em aves e produtos derivados (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997).

A SH é frequentemente isolada em carnes, predominantemente em cortes como o peito de frango e foram resistentes a uma classe de antimicrobianos (FDA, 2010).

Salmonella Heidelberg foi isolada em frangos de corte após a depenagem e na água do chiller, indicando que embora não tenha sido realizado o isolamento em outros pontos, a bactéria estava presente e poderia contaminar outras carcaças prontas para o consumo com reflexos na saúde pública. O isolamento de SH reforça

esta preocupação uma vez que este sorovar tem se destacado como causador de doenças transmitidas por alimentos (COLLA et al., 2012).

A presença de rações contaminadas e ambientes, são as maiores formas de introduzir *Salmonella* nos sistemas de produção (TESSARI et al., 2003).

A SH alcança o conteúdo dos ovos em 2 horas e 16 minutos e 2 horas e 44 minutos após a contaminação da casca em ovos brancos e vermelhos, respectivamente (RAGUIANTE et al., 2010).

A notificação e os registros epidemiológicos são uma importante fonte de informações para que os órgãos competentes de fiscalização e controle, possam estimar quais os patógenos e grupos de alimentos possivelmente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares, como exemplo verifica-se a presença de vários sorotipos de *Salmonella* nos plantéis de suínos, dos quais a alguns anos atrás não havia alta prevalência e que na atualidade, representam mundialmente um grave problema de saúde pública (SHINOHARA et al., 2008).

Em um estudo realizado por Nascimento (2007), os pacientes com infecção por *Salmonella* Spp., constituem fatores de risco para o óbito a febre e a perda ponderal, o isolamento de *Salmonella* sorotipo não-Typhi, e a sorologia anti-HIV reagente. Em pacientes com infecção por *Salmonella* Spp., e com sorologia anti-HIV reagente, não é possível atribuir o óbito em caso da presença de patologias oportunistas.

Algumas bactérias como a *Salmonella* são invasivas e podem chegar à corrente sanguínea através das paredes do intestino, causando infecções generalizadas (FORSYTHE, 2013).

Alimentos contaminados causam um dos maiores problemas de saúde no mundo e geram uma redução de produtividade econômica (BETTCHER; YACH; GUINDON, 2000).

A *Salmonella* em geral causa uma das seguintes doenças, gastroenterites (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*), febre entérica (*S. Typhi* e *S. Paratyphi* e doença sistêmica invasiva (*S. Cholerasuis*). Os sintomas característicos de doença de origem alimentar causadas por *Salmonella* incluem: diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda, calafrios e algumas vezes vômitos, cefaleia e fraqueza (FORSYTHE, 2013).

O amplo uso de agentes antimicrobianos tem sido alvo de restrições, na União Européia em 2006, será proibida a utilização de promotores de crescimento na produção animal (BUTAYE; DEVRIESE; HAESEBROUK, 2003).

Um estudo realizado na Holanda, Van Duijkeren et al. (2003), compararam a susceptibilidade de sorovares de *Salmonella* isolados de 1984-1989 com isolados do período entre 1996-2001 e a multiresistência dos isolados em humanos variou de 3,2% a 45%, em suínos a variação foi de 3,9% para 41,7% e em aves foi de 1,8% para 25,2%, o sorovar *Typhimurium* foi o que evidenciou maiores percentuais de resistência.

Os maiores resultados de resistência para *Salmonella* foram obtidos para antibióticos das classes das sulfonamidas, seguidos pelo das tetraciclina e beta lactâmicos benzilpenicilâmicos, os quais tiveram seu uso banido no Brasil como promotores de crescimento. Esses resultados podem ser indicativos do uso não controlado ou não assistido desses antimicrobianos na avicultura, levando a seleção de cepas resistentes, o que dificulta seu controle (MENDONÇA, 2011).

Em um estudo realizado por Oliveira (2006), em que se avaliou a sensibilidade de *Salmonella* Spp. isoladas no estado do Ceará de produtos avícolas a diferentes antimicrobianos, revelou um resultado alarmante, por que 100% dos isolados foram resistentes a ampicilinas e tetraciclina.

Na Tabela 1, verifica-se o período de incubação e duração da enfermidade dos diferentes micro-organismos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares.

Tabela 1 - Micro-organismos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos

Micro-organismo	Período de incubação	Duração da enfermidade
<i>Aeromonas</i> spp	Desconhecido	1 a 7 dias
<i>C.jejuni</i>	3 a 5 dias	2 a 10 dias
<i>E.coli</i>	16 a 72 horas	3 a 5 dias
<i>Salmonella</i> Spp	16 a 72 horas	2 a 7 dias
<i>Shigella</i>	16 a 72 horas	2 a 7 dias
<i>Yersinia enterocolítica</i>	3 a 7 dias	1 a 3 semanas
Rotavírus	24 a 72 horas	4 a 6 dias

Fonte: Adaptado de Forsythe (2013)

Essa bactéria pode multiplicar-se na superfície de brotos de alfafa, tomates, outras frutas e vegetais crus, portanto é essencial que práticas de higiênicas sejam observadas durante a manipulação desse produto para reduzir a contaminação. A

Salmonella pode contaminar o cacau durante a colheita e fermentação, o cacau é ligeiramente tostado (60-80°C) durante a produção de chocolate. A *Salmonella* pode sobreviver devido ao mínimo processamento, à baixa atividade de água e ao alto teor de gordura, os quais ajudam na proteção do organismo durante o trânsito pelo estômago (FORSYTHE, 2013).

O isolamento de *Salmonella* é reportado como mais frequente em aves e produtos de aves ou em qualquer outra fonte de origem animal, isto particularmente é devido a alta prevalência de infecções nas aves por *Salmonella*, mas também reflete no grande número de aves comerciais sendo criados ao redor do mundo e aos programas de controle que identificam a presença de *Salmonella* nos plantéis em muitos países (GAST, 2003).

A *Salmonella* é um grande problema em aves ao redor do mundo, a maioria dos países regulam a presença deste microorganismo nas aves e a indústria avícola destes países necessitam atender a um padrão sem salmonela. Nenhum outro patógeno é tão fortemente regulado nos produtos avícolas (RUSSEL, 2012).

Em um estudo realizado para avaliar a presença de *Salmonella* Spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia no estado de Goiás, revelou que 11,1% das caixas foram positivas para *Salmonella* Spp., e nos órgãos de pintos 3%, o que sugere que há transmissão vertical do agente (ROCHA et al., 2003).

Em um monitoramento bacteriológico para *Salmonella* Spp. realizado em poedeiras comerciais de empresas avícolas da região metropolitana de Fortaleza (CE), revelou que não houve transmissão vertical, e que a transmissão por *Salmonella* ocorreu após a chegada dos pintainhos as granjas, mostrando que houve falhas na biosseguridade das granjas (CASTRO et al., 2008)

Em um estudo conduzido por Tessari et al. (2008) para avaliar a ocorrência de *Salmonella* Spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do estado de São Paulo, resultou que das 116 amostras analisadas, duas (1,7%) apresentaram contaminação e uma amostra (0,8%) foi positiva para *S. Enteritidis*, totalizando três amostras positivas, indicando a importância da implantação de programas específicos para controle de *Salmonella*.

Para alcançar o progresso na redução da incidência de *Salmonella* em aves e produtos derivados de aves necessita de uma implementação combinada de medidas de controle, como a eliminação biológica de vetores, efetiva limpeza e

desinfecção dos galpões avícolas, rigorosos controles de biossegurança e tratamentos profiláticos para reduzir a susceptibilidade da infecção (GAST, 2003).

2.2 Probióticos

Lilly e Stillwell (1965) foram os primeiros pesquisadores a utilizar o termo probiótico, na qual observaram a ação de microorganismos como promotores de crescimento.

Segundo Fuller (1989), probióticos são suplementos alimentares à base de microorganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço da microbiota intestinal.

As doenças entéricas tornam-se um dos maiores desafios na avicultura industrial mundial nos últimos anos devido a perda de produtividade, ao aumento de mortalidade e à contaminação de produtos de origem avícola para o consumo humano, que elas determinam. Com frequência crescente, produtos avícolas têm sido relacionados com toxiinfecções alimentares em humanos e em vários países, sugerindo que produtos elaborados com carne de aves portadoras de bactérias que possam ser fontes de infecção (SANTOS; TURNES, 2005).

A possibilidade do cancelamento do uso dos antibióticos como melhoradores de desempenho nos animais de produção e as consequências do uso dos agentes antimicrobianos fazem com que ambos produtores e consumidores busquem alternativas ao uso dos antibióticos, os probióticos estão sendo capazes de cumprir este papel, e alguns produtores já estão usando os probióticos com este objetivo (FULLER, 1989).

Os probióticos são usados em medicina humana na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese. Em medicina veterinária, além dessas aplicações, podem também ser usados como promotores de crescimento, constituindo-se em uma alternativa aos antibióticos, cujo uso discriminado pode selecionar cepas resistentes (COPOLLA; TURNES, 2004).

Das muitas ações dos probióticos incluem supressão de diarreias, atividade antitumoral, estímulo da imunidade, alívio da intolerância a lactose e melhora no crescimento de animais de produção (FULLER, 1989). Schezenmeim e Vrese (2001) propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar

preparações ou produtos que contêm microorganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, que produzem efeitos benéficos em sua saúde.

Os probióticos se empregam para prevenir ou tratar diversas disfunções gastrointestinais, tais como, intolerância a lactose, constipação, hipersensibilidade alimentar e gastroenterite, ou relacionadas a elas, como alergias e dermatite atópica (SALMINEN et al., 1998).

Os probióticos vêm sendo utilizados há anos na alimentação humana, tanto com finalidade profilática como terapêutica. Embora existam vários estudos que mostram seus benefícios como aditivos na alimentação animal, ainda há uma certa resistência por parte do setor avícola em sua utilização (SANTOS; TURNES, 2005).

A habilidade de adesão ao epitélio intestinal é essencial para a permanência e colonização dos microorganismos no trato gastrointestinal desta forma, evitam ser removidos através de movimentos peristálticos (SERVIN; COCONNIER, 2003).

A utilização de bactérias probióticas como, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarium*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, na dieta de frangos de corte aumenta a expressão de células caliciformes, CD4⁺ e CD8⁺ na mucosa intestinal das aves e reduz o isolamento de *Salmonella* Spp. no ceco das aves após o desafio microbiológico (LOURENÇO et al., 2013).

De acordo com Fox (1988), aproximadamente 90% da flora intestinal das aves é composta por bactérias facultativas produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, etc.) e bactérias anaeróbicas estritas (*Fusobacterium*, *Eubacterium*, etc.) Os 10% restantes consistem de *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e outros).

A principal vantagem de *Bacillus* sobre as bactérias ácido lácticas, na elaboração de probióticos, reside na sua capacidade de esporular, o que lhes confere maior sobrevivência durante o trânsito estomacal (HAO et al., 2000).

O modo de ação dos probióticos não foi totalmente esclarecido, embora tenham sido sugeridos vários processos que podem atuar independentemente ou associados. Um deles é a exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítio de ação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente (CROSS, 2002).

Os probióticos possuem efeitos benéficos nas inflamações intestinais como inibição do crescimento de patógenos microbianos, crescente aumento das junções epiteliais e modificação da permeabilidade intestinal, modulação da resposta imune e das células imunes da mucosa intestinal, secreção de produtos antimicrobianos e decomposição dos antígenos luminiais patogênicos (FERREIRA et al., 2010).

Os efeitos dos probióticos parecem ser mais consistentes em animais de crescimento do que em animais adultos e também que a variabilidade dos resultados nas pesquisas realizadas, pode ainda estar associada as diferentes cepas, níveis de dose, condições de armazenamento, composição da dieta, estratégia de alimentação e interação com drogas. Uma vez que os probióticos são adicionados as rações, os mesmos devem estar estáveis nos alimentos, resistentes aos antimicrobianos presentes nas rações, bem como no trato digestivo e seus ácidos digestivos (LANCINI, 1992).

Aristides (2010) demonstrou que os probióticos podem substituir os promotores de crescimento sem alterar quantitativamente o ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração, conversão alimentar, viabilidade, rendimento de carcaça e cortes.

A adição de probióticos nas rações dos animais tem sido cada vez mais como uma forma natural e ecologicamente correta, eficaz e segura para promover a qualidade da saúde intestinal. No mercado brasileiro e mundial, apresentam-se produtos de várias composições e fórmulas com indicações positivas para uso preventivo de infecções intestinais, no restabelecimento da microbiota intestinal e ganho de peso de animais de produção (NOGUEIRA, 2010).

A utilização de bactérias probióticas como *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarium*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, na dieta de frangos de corte aumenta a expressão de células TCD4+, TCD8+ e caliciformes na mucosa intestinal e reduz o isolamento de *Salmonella* Spp. no ceco de aves após desafio microbiológico (LORENÇO et al., 2013).

Szabó et al. (2009), utilizando *Enterococcus faecium* como cepa probiótica contra desafio de *S. Typhimurium* constatou que o probiótico não protegeu da infecção por *Salmonella* se comparada ao grupo controle, sendo que o grupo tratado eliminou maiores quantidades de *Salmonella*.

2.3 *Bacillus amyloliquefaciens*

Islam et al. (2011), revelaram que cepas de *B. amyloliquefaciens* isoladas de solos do noroeste do Himalaia, possui efeito benéfico com ação probiótica contra doença inflamatória intestinal, o que sugere que estas cepas podem ser utilizadas nos alimentos como agente curativo.

Bacillus amyloliquefaciens é muito conhecido por sua produção de enzimas e pelas aplicações destas. No entanto, as pesquisas e trabalhos relacionados a pesquisa de produção de substâncias antimicrobianas não são - (LISBOA, 2006).

Bacillus amyloliquefaciens são bastonetes gram positivos, móveis por flagelos peritríquios, esporogênicos e que crescem bem em caldo suplementado com 7% de NaCl. Seu perfil bioquímico se caracteriza por provocar a hidrólise do amido; produzir acetimetilcarbinol; fermentar carboidratos como glicose, sacarose e lactose com produção de gás; hidrolisar a gelatina e reduzir o nitrato a nitrito. e são responsáveis pela produção mundial de alfa amylase e protease (WELKER; CAMPBELL, 1967).

Bacillus amyloliquefaciens e *B. subtilis* possuem propriedades comuns e poucas características foram encontradas para diferenciar as espécies (PRIEST et al., 1987).

O *B. amyloliquefaciens* é conhecido por produzir iturinas uma família de antibióticos lipopeptídeos cíclicos (HIRIDATE, et al., 2002). *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* estão proximamente relacionados em produzir uma diversidade de antibióticos lipopeptídeos, como surfactinas, iturinas, bacilomicinas e micosubtilinas (STEIN, 2005).

Porém, a espécie *B. amyloliquefaciens* pode ser distinguida da espécie *B. subtilis* por possuir uma porcentagem de G+C um pouco maior em seu DNA, enquanto *B. subtilis* possui 41,5% a 43,5%, o *B. amyloliquefaciens* possui de 43,5% a 44,9% de G+C (YOSHIDA et al., 2001)

Verificou-se que *B. amyloliquefaciens* produz uma substância capaz de inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, de acordo com os resultados, obtidos a inibição ser devida a ácidos ou peróxidos de hidrogênio, tampouco a exaustão de nutrientes (BATISTA, 1993).

A maioria das substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por bactérias do gênero *Bacillus spp.* são ativas contra bactérias Gram-negativas

(SLEPECKY; HEMPHILL, 1992). Entretanto, muitas pesquisas apontam cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antimicrobiana de espectro amplo.

As cepas de *B. amyloliquefaciens* são altamente amilolíticas fato que se atribuía apenas a amilase produzida por *Bacillus subtilis*, mas após o trabalho de Welker e Campbell (1967), se comprovou que as amilases eram bioquimicamente e geneticamente relacionadas ao *B. amyloliquefaciens*.

Cepas de *B. amyloliquefaciens* (LBM 5006) isoladas de solos produzem substâncias que inibem bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Serratia marcescens* e *Pasteurella haemolytica* (LISBOA et al., 2006).

Benitez (2010) revelou que a cepa de *B. amyloliquefaciens* LBM 5006, produz uma mistura de antimicrobianos peptídeos durante o cultivo em caldo BHI. O mesmo autor mostrou que, além da cepa de *B. amyloliquefaciens* produzirem peptídeos que atuam contra bactérias, também a iturina produzida por esta cepa possui atividade inibitória contra alguns fungos como *Aspergillus phoenicis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum f. lycopersici*, entre outros, sugerindo uma larga atividade inibitória associada a peptídeos como fengycin e iturina.

Diversas enzimas como: α -amilase, galactaminase, isoamilase, xilanase, metal protease, serina protease, fosfatase alcalina e ribonuclease são produzidas por *B. amyloliquefaciens* (PRIEST, 1977).

Quanto a produção de substâncias antimicrobianas por linhagens de *B. amyloliquefaciens*, verificou a existência de atividade antifúngica e inibidora de algumas bactérias fitopatogênicas no sobrenadante filtrado da cultura de uma linhagem pertencente a esta espécie (YOSHIDA et al., 2001).

Em estudos realizados com ratos, a inoculação de *B. amyloliquefaciens* facilita a polarização dos macrófagos M1 e aumenta consideravelmente a capacidade fagocítica dos mesmos (JIAN et al., 2013).

2.4 Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos fracos são conhecidos como conservantes de alimentos, pois inibem a multiplicação de células bacterianas e fúngicas (FORSYTHE, 2013). A inibição da multiplicação bacteriana pode ser devida a diversos fatores, como, por exemplo, rompimento da função da membrana e inibição de reações metabólicas essenciais (BRACEY; HOLYOAK; COOTE, 1998; EKLUND, 1985).

Por definição, ácidos orgânicos são substâncias que têm uma carboxila na molécula, assim todos os ácidos e mesmo os aminoácidos são ácidos orgânicos além de muitas outras substâncias que se enquadram nessa classificação. Quando o termo ácido orgânico é empregado, subentende-se que se trata de ácidos graxos voláteis de cadeia curta e que eventualmente podem ser chamados de ácidos fracos (PENZ; SILVA; RODRIGUES, 1993). Ao contrário dos ácidos inorgânicos, os ácidos orgânicos são facilmente absorvidos através da parede celular das bactérias. Uma vez na célula, a porção aniônica do ácido danifica a estrutura do DNA no núcleo das células e, conseqüentemente, as bactérias não conseguem mais se dividir ou podem até acabar morrendo. A porção catiônica liberada dos ácidos, reduz o nível do pH da célula, obrigando a mesma a utilizar sua energia para liberar os prótons, levando a uma exaustão das células (LANGHOUT, 2005).

A cadeia do ácido orgânico pode ser agrupada em ácidos de cadeia curta, média ou longa de acordo com o número de carbonos (1-6, 7-10 e 11 ou mais carbonos), ácidos com 4 carbonos ou menos (fórmico, acético, propiônico e butírico), são líquidos em temperatura ambiente e miscíveis em água (CHERRINGTON; HINTON; CHOPRA, 1991).

Acredita-se que os ácidos orgânicos exercem atividade antimicrobiana devido a redução do pH no interior da célula microbiana (CHERRINGTON; HINTON; CHOPRA, 1991; ROTH, 1998).

Stratford et al. (2009), demonstraram que nem todos os ácidos necessitam reduzir o pH citoplasmático para exercer sua atividade antimicrobiana, 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, sendo que a lesão da membrana causa perda da integridade e o aumento a permeabilidade a prótons, que levam a morte do microorganismo.

O mecanismo de ação dos ácidos orgânicos sobre o eptélio intestinal poderia ser atribuído à menor flora de bactérias patogênicas presentes, devido a sua capacidade de reduzir o pH no meio intestinal, dificultando a adesão de bactérias ao eptélio, gerando desta forma um eptélio com menor dano devido a multiplicação de bactérias patogênicas (SALAZAR et al., 2008).

Todo o ácido tem uma ou mais constantes de dissociação (K_a), que podem ser representadas pelo potencial de dissociação pK_a (que é o logaritmo negativo da constante de dissociação) e que identificam sua capacidade acidificante. Quanto

mais fácil um ácido doa seu(s) hidrogênio(s) para o meio, mais forte ele é considerado (MURRAY et al., 1990).

Os ácidos orgânicos associados a atividade antimicrobiana são ácidos 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; BUTIN, 2002).

Nesse sentido, muitos estudos tem sido realizados com ácidos fórmico, propiônico, butírico, láctico e cítrico, para avaliar suas ações no eptélio intestinal (KNUDSEN et al., 2003)

Van Immerseel et al. (2003), ao estudarem a interação *in vitro* entre *Salmonella* Spp. Tratada com ácido butírico e cultivos primários de células epiteliais cecais em frangos, observaram a invasão bacteriana nas células epiteliais. No entanto o tratamento prévio da salmonela com o ácido butírico causou uma diminuição significativa na invasão bacteriana nas células epiteliais de origem cecal, já no tratamento prévio com ácido acético houve aumento significativo no grau de invasão.

Em aves, as bactérias patogênicas (e.g. *Salmonella*) atingem o trato digestivo após vencerem a barreira do papo (inglúvio). A existência de um ambiente ácido com pH baixo no papo é muito importante para impedir ou diminuir a colonização de patógenos no trato digestivo. A quantidade de *Lactobacillus* e pH baixo no papo têm mostrado reduzir a ocorrência de *Salmonella* (HINTON; BUHR; INGRAM, 2000).

Calaça (2009), concluíram que a adição de ácidos orgânicos (ácido acético, fórmico e propiônico) na proporção de 4 kg por tonelada de ração pode ser recomendada, pois promoveu melhorias no desempenho zootécnico dos frangos de corte, beneficiando a saúde intestinal com reflexos positivos no controle de *S. Enteritidis* juntamente com a *Eimeria tenella*.

O ácido butírico possui algumas propriedades anti-inflamatórias, onde mucosas intestinais danificadas, apresentam melhor cicatrização na presença de maiores níveis de ácido butírico (WÄCHTERSCHÄUSER, 2000).

Conforme Pickler (2011), em estudos com ácidos orgânicos para o controle de *Salmonella* e de desempenho, os resultados obtidos são contraditórios provavelmente devido aos diferentes mecanismos de ação, condições ambientais, dose do produto utilizado e parâmetros avaliados.

Leandro et al. (2010), avaliando a biometria intestinal de pintos suplementados com ácido butírico, observaram que a suplementação do ácido aumentou o comprimento do intestino se comparado aos demais tratamentos.

Bassan et al. (2006), ao estudarem a população microbiana em frangos de corte tratados com um ácido orgânico na ração confirmaram que o ácido possuem propriedades físico-químicas que podem alterar a população de microorganismos presentes no trato gastrointestinal dificultando ou facilitando a adesão de patógenos no epitélio intestinal. Na análise bacteriológica detectou uma redução significativa para *S. Enteritidis* ao fazer a comparação com outros aditivos.

Os ácidos orgânicos reduzem significativamente a excreção de *S. Enteritidis* em papo e ceco de frangos, independente da via de administração, porém são pouco efetivos no controle de *S. Minnesota* (PICKLER, 2011).

Os ácidos orgânicos fórmico e propiônico são inócuos ao organismo das aves, ou seja, não causaram nenhum dano ao organismo das aves sendo que estes dois ácidos contribuem para o controle de infecção por *S. Enteritidis* (BASSAN et al., 2008).

Uma redução no valor de pH do estômago resultante da ingestão de ácidos na ração pode inibir o crescimento bacteriano em leitões nos quais a secreção de HCl não está suficientemente baixo para tal crescimento. Para frangos de corte, contudo, o efeito de redução de pH de um ácido no estômago pode não ser significativo, embora no papo uma redução no valor de pH possa ter um papel importante, especialmente em pintos (LANGHOUT, 2005).

A utilização de 0,3% de ácido cítrico na dieta para frangos de corte resultou em um aumento significativo na digestibilidade de 3 unidades percentuais na absorção da maioria dos aminoácidos aos 4 dias de idade, porém não demonstrou nenhum efeito significativo aos 21 dias de idade (BIGGS; PARSONS, 2008).

2.5 Objetivos Gerais

Avaliar o uso dos probióticos e ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH).

2.6 Objetivos Específicos

Avaliar qualitativamente através de isolamento bacteriano, a presença de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg após o uso dos probióticos e ácidos orgânicos.

Avaliar quantitativamente a presença de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg através de diluições e cultivo em meios de enriquecimento e seletivo após o uso de probióticos e ácidos orgânicos e a inoculação de SH.

Avaliação do peso médio das aves semanalmente após desafio de SH.

Avaliação da morfometria intestinal de aves com idade de 22 dias e desafiadas com SH.

Através do uso destas metodologias busca-se resultados que possam argumentar uso de probióticos e ácidos orgânicos na avicultura de corte.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi realizado no Biotério de aves da Universidade Federal do Paraná- Setor Palotina, no período de 29 de outubro a 20 de novembro de 2013. Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina.

3.2 Aves

Para o experimento foram utilizados 300 pintos de corte, com um dia de idade, machos da linhagem Cobb, adquiridos de uma empresa integradora de aves de corte, provenientes de matrizes de 55 semanas. A dieta das matrizes foi isenta de qualquer quimioterápicos. As aves foram alojadas em gaiolas forradas com papel kraft e maravalha, sendo o ambiente pré aquecido 2 horas anteriores ao horário do alojamento, obtendo a temperatura dentro da zona de conforto ideal para as aves conforme manual da linhagem.

Previamente ao alojamento, a fim de se comprovar a ausência de *Salmonella* Spp. Foram sacrificadas 4 aves por tratamento realizando o procedimento de isolamento conforme a metodologia de (MALLINSON; SNOEYENBOS, 1989).

3.3 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições com 15 aves cada, totalizando 300 aves. No dia do alojamento das aves (dia 0), foi realizado a inoculação de *Salmonella* Heidelberg (SH) via depósito direto no esôfago/inglúvio com auxílio de pipeta graduada 1 ml. Os tratamentos com probiótico foram realizados via ração e com ácido via água de bebida ad libitum do dia do alojamento até o momento final do experimento. Os tratamentos consistiram de:

- T1 - Aves não tratadas e não desafiadas com SH (controle negativo);
- T2 - Aves não tratadas e desafiadas com SH (controle positivo);
- T3 - Aves tratadas com probiótico (*Bacillus amyloliquefaciens*) e desafiadas com SH;
- T4 - Aves tratadas com mistura de ácidos orgânicos (acético; butírico e láctico) e desafiadas com SH;
- T5 - Aves tratadas com probióticos + ácidos orgânicos e desafiadas com SH.

3.4 Descrição dos Tratamentos

Os tratamentos foram descritos como o T1 - controle negativo, sem adição de ácido ou probiótico por via oral as aves; T2- controle positivo inoculada as aves *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH); T3- aves tratadas com probiótico via ração *Bacillus amyloliquefaciens* ($1 \times 10^{12} \text{Kg}^{-1}$) na dosagem de (100g/ton) e desafiadas com SH; T4- aves tratadas com ácidos orgânicos via água de bebida (490ml/1000L água); T5- aves tratadas com probiótico (*Bacillus amyloliquefaciens*) e ácidos orgânicos(ácido láctico, ácido acético e ácido butírico) e desafiadas com SH.

Os tratamentos 4 e 5 receberam uma mistura de ácidos orgânicos na qual foi adquirida comercialmente constituída de ácido láctico (399g/kg), ácido butírico (0,99g/kg) e ácido acético (69,65g/kg), administradas as aves via água de bebida

desde o dia do alojamento até o final do período experimental continuamente na proporção de 4,90ml da mistura de ácidos orgânicos em 100 litros de água, na qual nesta dosagem o ph se manteve em 4. O ph da água foi medido diariamente através do uso equipamento de medição de pH digital ph-100 (Phtek®).

Para realizar a mistura do ácido foi utilizado uma proveta graduada de 20 mL e um balde de 20 litros sendo que após a obtenção da mistura o conteúdo do balde foram distribuídos nos bebedouros fornecidos *ad libitum*.

A cepa utilizada como probiótico foi *Bacillus amyloliquefaciens* fornecida comercialmente na concentração de $(1 \times 10^{12} \text{UFC/Kg}^{-1})$.na forma liofilizada para mistura em rações. O probiótico foi misturado nas rações para os tratamentos 3 e 5 na dosagem de 100g/tonelada de ração, de forma sem interrupção. A mistura do probiótico a ração foi realizada com auxílio de um misturador manual de 50 kg.

3.5 Ambiente

O alojamento das aves ocorreu em gaiolas dispostas separadamente em uma sala única de 30 m², sendo que as gaiolas foram forradas com maravalha de pinus e papel Kraft. Cada gaiola com área de 100cm x 80cm de superfície sendo 4 gaiolas por tratamento. O ambiente foi mantido a temperatura de conforto térmico para as aves conforme manual da linhagem, sendo que o suprimento de calor realizado através de aquecedores elétricos associados a condicionadores de ar e a ventilação/renovação do ar por meio de exaustores posicionados na parede da sala. Antes do alojamento das aves certificou-se que as aves estavam livres de *Salmonella Spp.*, procedendo com o sacrifício de 4 aves por tratamento para realizar o procedimento de isolamento de *Salmonella Spp.*, de acordo com a metodologia de Mallinson e Snoeyenbos (1989).

Antes do alojamento das aves nas gaiolas e distribuição das mesmas nas gaiolas, realizou-se a pesagem repetindo nos dias 8,15 e 22 dias. Não foi realizado conversão alimentar, nem o consumo de ração durante o experimento.

O fornecimento de água foi realizado com auxílio de bebedouros manuais (1 por gaiola) e tipo nipples (6 por gaiola), sem interrupção em ambos os tratamentos sendo a limpeza realizada diariamente, com a frequência de 3 vezes ao dia a fim de manter a temperatura e qualidade adequada da água fornecida aos animais.

Os comedouros utilizados foram em número de um por gaiola, havendo a limpeza diariamente dos mesmos para assegurar um bom acesso a ração para as aves.

Na Figura 1, a ilustração demonstra o ambiente onde as aves foram mantidas durante o período experimental.



Figura 1 - Sala contendo as gaiolas com os grupos controle e tratamentos

Fonte: Simões (2014).

3.6 Amostras de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg

As amostras contendo cepas de SH foram cedidas pelo Laboratório Mercolab-Cascavel (PR). As amostras chegaram ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná acondicionadas em bolsas estéreis (Nasco Whirl-Park®) sendo a mesma resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif) desenvolvidas por cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (100 µg/ml de meio) Andreatti Filho, Silva e Curi (1997) para facilitar posterior enumeração bacteriana.

3.7 Inóculo de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH)

Para o preparo do inóculo, a amostra com colônias de SH foi retirada do Ágar estoque e incubada em caldo BHI (Brain Heart Infusion) incubados a 37°C por 24

horas. Em seguida, semeou-se esta solução em uma placa com Agar Mueller Hinton por 24h a 37°C. A placa foi lavada, com solução estéril, e retirou-se o líquido que foi diluído até a concentração 0,5 da escala de Mac Farland o que corresponde a uma concentração de 1×10^8 UFC/mL, após fez-se as diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de solução fisiológica estéril até a diluição de 10^5 UFC/mL.

O inóculo foi administrado via oral com o auxílio de uma pipeta graduada de 1mL por ave imediatamente antes do alojamento das aves nas gaiolas (Tratamentos 2, 3, 4 e 5).

3.8 Cultivo Microbiológico

As coletas de cecos, inglúvios, fígados e suabes de cloaca foram realizadas nos períodos de 24 horas, 8 dias, 15 dias e 22 dias após a inoculação (desafio). Foram sacrificadas 2 aves/repetição em cada uma das idades, de acordo com resolução nº1000, de 11 de maio de 2012 (CFMV).

3.8.1 Fígado

Foram coletados assepticamente os fígados das aves sacrificadas em número de 8 por tratamento, identificados e colocados em bolsas estéreis (Nasco Whirl-Park[®]) transportados em caixa isotérmica com gelo até o local das análises.

As amostras de fígados foram devidamente identificadas e transferidas para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivos (tetracionato e selenito cistina), na proporção de 1:10. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de enriquecimento, alíquotas dos caldos foram transferidas para as placas de Petri contendo ágar MacConkey e ágar Verde Brilhante (AVB), procedendo a semeadura em superfície por esgotamento em estrias. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Para a confirmação dos resultados, as colônias compatíveis com *Salmonella* foram submetidas as provas bioquímicas tais como ágar TSI (Triple Sugar Iron) e caldo de uréia e sorologia com antissoro polivalente "0" para *Salmonella*.

3.8.2 Suabe cloacal

A cada coleta foram realizados 8 suabes de cloaca por tratamento, o que equivale a 1 suabe por ave, as quais foram cultivados visando o isolamento de SH. Após a coleta, os suabes foram acondicionados em caixa isotérmica com gelo, e imediatamente transportados para o laboratório.

As amostras de suabes foram colocadas em tubos contendo 10 mL de caldo seletivo de enriquecimento (tetracionato e selenito cistina), e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de enriquecimento alíquotas do caldo foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MacConckey e AVB (ágar verde brilhante), procedendo a semeadura em superfície por esgotamento por estrias, após as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas (MALLINSON; SNOEYENBOS, 1989).

3.8.3 Cecos e Inglúvios

Os cecos e inglúvios foram coletados de forma asséptica e colocados em bolsas plásticas estéreis (Nasco-Whirl- Pak[®]) de 8 aves por tratamento. Nas bolsas contendo as amostras foram colocados 50 mL de água peptonada a 1% na proporção de 1:10, obtendo uma diluição de 10⁻¹.

As amostras foram maceradas por 1 minuto e alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de ensaio com 9 mL de solução de PBS realizando-se as demais diluições decimais até 10⁻⁸.

As determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento das respectivas diluições em duplicata de AVB e MacConckey. O inóculo de 0,1mL das respectivas diluições foram espalhado com o auxílio de alça de Drigalski, e as placas foram incubadas a temperatura de 37°C a 24 horas. O número de UFC/mL foram convertidos em log₁₀ para interpretação dos resultados.

Na Figura 2, observa-se a presença de colônias de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg 24 horas após a semeadura com a mudança na coloração do meio.

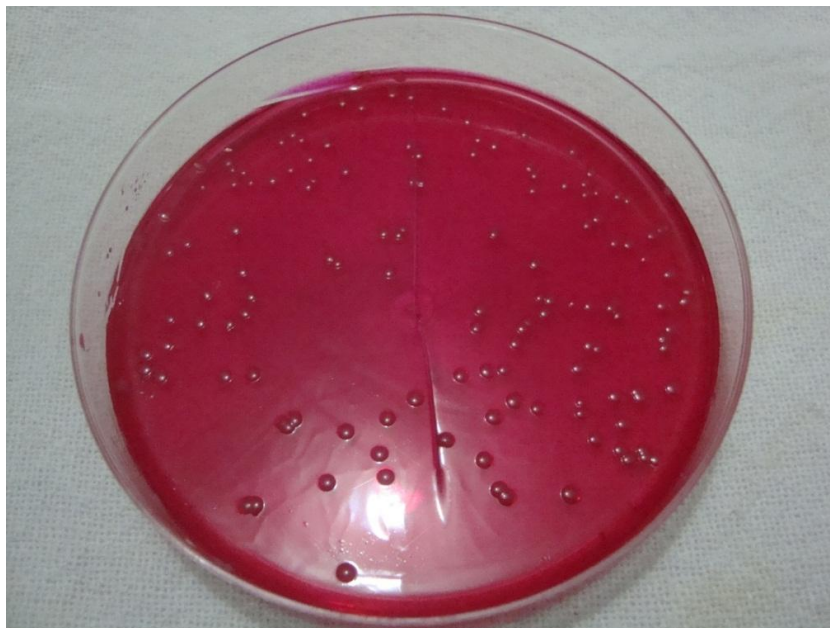


Figura 2 - Placa com colônias de *Salmonella* Heidelberg em ágar verde brilhante
Fonte: Simões (2014).

3.9 Morfometria das vilosidades e criptas intestinais

Para o estudo morfométrico da mucosa do duodeno coletou-se amostras de 2 aves/repetição (8 aves/tratamento) na idade de 22 dias. Amostras individuais de aproximadamente um centímetro de comprimento abertas pela borda mesentérica, estendidas pela túnica serosa e fixadas em solução de formol tamponado a 10 % por 18 horas. Posteriormente foram recortadas e lavadas com uma solução de álcool etílico a 70% e desidratadas em uma crescente de álcool etílico. Após a desidratação, foram diafanizadas em uma solução de xilol e incluídas em parafina. Cada fragmento foi submetido à cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura e corados por hematoxilina-eosina. Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (Olympus BX 50) em objetiva de 10x, utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Neste estudo foram mensurados o comprimento de 20 vilos e a profundidade de 20 criptas.

3.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS (1992), análise de variância não paramétrica para as análises de fígados e suabes

de cloaca e análise de variância paramétrica de um modelo complementar pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para as análises de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de Inglúvios e cecos, comprimento das vilosidades; cripta e relação vilo:cripta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem bacteriana-Inglúvio

As contagens de colônias de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) no Inglúvio encontram-se na Tabela 2 representadas em \log_{10}/ml .

Tabela 2 - Contagem de colônias de SH em \log_{10}/mL no Inglúvio de aves desafiadas com SH e tratamentos nas diferentes idades após inoculação

Tratamentos	Contagem de colônias (\log_{10}/mL)			
	24 hs	8 dias	15 dias	22 dias
Controle negativo	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c
Controle positivo	18,77 ^a	7,68 ^a	6,708 ^a	11,485 ^a
Probióticos	10,009 ^b	5,05 ^{ab}	3,62 ^a	2,10 ^b
Ácidos Orgânicos	16,97 ^a	8,03 ^a	5,31 ^a	4,49 ^{ab}
Probióticos + Ác. orgânicos	17,22 ^a	3,56 ^{ab}	2,73 ^a	5,25 ^{ab}
CV%	24,35	92,59	128,18	128,74
Valor de P	0,0001	0,0064	0,079	0,0073

*Médias com as letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

No controle negativo onde não ocorreu desafio e tratamento não houve contagem de SH no Inglúvio nas idades pesquisadas Todos os demais tratamentos e grupo controle positivo houve contagem bacteriana de SH.

Nas primeiras 24 horas após a inoculação, houve significativa menor contagem bacteriana de SH no tratamento com probióticos, o que pode ser devido ao efeito antibacteriano da cepa probiótica no Inglúvio.

Nos tratamentos com probiótico houve significativa menor contagem bacteriana de SH ($p < 0,05$) nos 22 dias em relação aos demais tratamentos e grupo controle positivo. Nos demais tratamentos somente houve diferença significativa entre os tratamentos e controle negativo no decorrer do período experimental, sendo que nos 22 dias não ocorreu redução significativa entre os tratamentos, mas sim redução significativa ($p < 0,05$) em relação do tratamento com probióticos e controle

positivo. Avila et al. (2003), observaram redução na contagem bacteriana de *Salmonella* sp. no papo de aves com adição de uma mistura comercial de ácidos na água 24 horas antes do abate. Tellez et al. (2013), avaliando ácidos orgânicos como acético, láctico, propiônico adicionados via água de bebida para frangos de corte desafiados com *Salmonella* Typhimurium (ST), observaram significativa redução de ST nos cecos e inglúvio das aves tratadas com ácidos orgânicos quando comparados com os grupos controle, sem tratamento com ácidos.

Em um estudo avaliando a atividade in vitro de ácido láctico (0,47%), ácido cítrico (0,8%) e ácido cítrico (0,6%) com sulfato de cobre e D-limoneno contra *S. Enteritidis* observou-se que o ácido cítrico adicionado isoladamente foi menos efetivo na redução, sendo que o ácido láctico e ácido cítrico com sulfato de cobre e D-limoneno obteve maior eficiência, desta forma o autor sugere que a associação do ácido cítrico e D-limoneno potencializaram o seu efeito (SPAGNOL et al., 2002). Com base nesta citação, confirma o efeito do ácido láctico no controle de *S. Enteritidis*. Resultados positivos também foram obtidos por Pickler (2011), em que no uso dos ácidos orgânicos reduziu significativamente *S. Enteritidis* no papo e ceco de frangos, mesmo resultado não foi para a excreção de *S. Minnesota*.

4.2 Contagem bacteriana-cecos

Os resultados obtidos de contagem bacteriana estão dispostos na Tabela 3 representados por UFC(\log_{10} /mL).

Tabela 3 - Contagem de colônias de SH em \log_{10} /ml no ceco de aves desafiadas com SH e tratamentos nas diferentes idades após inoculação

Tratamentos	Contagem de colônias (\log_{10} /mL)			
	24 hs	8 dias	15 dias	22 dias
Controle negativo	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
Controle positivo	17,92 ^b	10,86 ^a	8,65 ^a	2,83 ^{ab}
Probióticos	18,46 ^b	11,98 ^a	9,73 ^a	3,03 ^{ab}
Ácidos Orgânicos	17,81 ^b	12,73 ^a	6,42 ^{ab}	8,68 ^a
Probióticos + Ác. orgânicos	14,87 ^b	12,99 ^a	7,28 ^{ab}	5,76 ^{ab}
CV%	43,63	33,16	83,40	128,3
Valor de P	0,001	0,0085	0,0085	0,0284

*Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

O controle negativo relacionado ao grupo não desafiado com SH não apresentou contagem bacteriana de SH nos cecos nas idades avaliadas.

Nos tratamentos com probióticos, ácidos orgânicos, probióticos e ácidos orgânicos houve contagem bacteriana de SH em todas as idades avaliadas.

Não obteve-se diferença significativa ($p > 0,05$) na contagem bacteriana de SH nas diferentes idades avaliadas, na comparação entre os tratamentos com probióticos, ácidos orgânicos, probióticos e ácidos orgânicos, porém o tratamento com ácido orgânico houve maior contagem, mas não diferiu significativamente entre os demais, já para Lorenço et al. (2013), usando probióticos em frangos de corte com 35 dias, inoculados com *S. Minnesota* houve diferença significativa ($p < 0,05$) na redução da contagem bacteriana de *Salmonella* Spp. no ingluvío e ceco em relação ao grupo controle.

Lima (2007), avaliando a contagem bacteriana no ceco de *S. Enteritidis* em aves de 42 dias experimentalmente desafiadas e tratadas com *pool* de *Lactobacillus*, prebiótico e *pool* de *Lactobacillus* e prebiótico, observou que somente os tratamentos com prebiótico e controle positivo tiveram elevadas contagens de *S. Enteritidis* apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) se comparada aos demais tratamentos, o que difere deste estudo, são as idades avaliadas, a concentração do inóculo e o probiótico e o sorovar da *Salmonella*.

Em um estudo de Carvalho et al. (2012) utilizando probióticos e desafio de *S. Enteritidis*, encontraram diferenças significativas ($p < 0,05$) na contagem entre os tratamentos com probióticos e grupo controle aos 5 dias de idade e nos 31 dias que também ocorreu diferenças significativas ($p < 0,05$), entre os tratamentos com probióticos e o controle, mais o controle positivo obteve menor contagem de *S. Enteritidis*.

Para Bassan et al. (2008), o uso de ácidos orgânicos e mananoligossacarídeos (MOS) contribui para a redução de aves contaminadas por *S. Enteritidis* em frangos de corte.

4.3 Medidas do comprimento das vilosidades, profundidade das criptas intestinais e relação vilo:cripta

Foram efetuadas 20 medições do comprimento das vilosidades, profundidade das criptas na porção duodenal e a relação vilo cripta aos 22 dias de idade (Tabela 4).

Tabela 4 - Comprimento do vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 22 dias de idade

Tratamentos	Vilo, μm	Cripta, μm	V:C
Controle negativo	1343,32 ^a	124,95 ^a	10,91 ^b
Controle positivo	1417,11 ^a	101,86 ^b	14,00 ^a
Probióticos	1388,92 ^a	115,03 ^{ab}	12,22 ^{ab}
Ácidos Orgânicos	1409,58 ^a	115,50 ^{ab}	12,40 ^{ab}
Probióticos + Ác. orgânicos	1423,52 ^a	124,20 ^a	12,69 ^{ab}
CV%	11,92	11,54	16,99
Valor de P	0,87	0,023	0,067

*Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos e os controles positivo e negativo com relação a profundidade das criptas aos 22 dias de idade ($p > 0,05$). Pickler (2011), com relação a variável profundidade das criptas no duodeno não encontrou nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados com ácidos orgânicos e desafio de *S. Enteritidis*.

Uma maior profundidade de cripta é consequência de uma maior atividade proliferativa para garantir adequada taxa de renovação celular e garantir a reposição das perdas das células na região apical das vilosidades (UTIYAMA, 2004)

Observa-se que a profundidade das criptas do grupo controle negativo em relação ao grupo controle positivo foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Não foram observados diferenças significativas ($p > 0,05$) nas medições de comprimento das vilosidades intestinais, entre os tratamentos T3; T4 e T5; controle negativo e controle positivo, conforme a Tabela 4.

Na relação vilo cripta foi observado que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos T3, T4 e T5, grupo controle negativo e positivo.

Pelicano (2002), testando probióticos via ração e via água para frangos de corte mostrou que aos 42 dias de idade os frangos que receberam probióticos apenas na ração apresentaram maior densidade de vilos em todos os segmentos analisados em relação ao grupo que recebeu probiótico associado (água +ração), essa menor contagem de vilo, segundo o autor foi compensada com uma maior altura de vilo no duodeno e um maior perímetro de vilo tanto no duodeno quanto no jejuno.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os obtidos por Salazar et al. (2008), em que avaliaram a morfometria intestinal de aves de corte tratados com ácidos orgânicos (lático e butírico) e concluiu que não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle para comprimento de vilosidades, profundidade de criptas e relação vilo:cripta.

Já para Pickler (2011), com relação a altura de vilosidades intestinais no duodeno, obteve menor altura de vilosidade nos grupos tratados com somente ácido orgânico na ração quando comparado aos demais tratamentos, que foram ácidos orgânicos via água de bebida e ração e controle sem adição de ácidos orgânicos.

Pelicano et al. (2007), observaram que o uso de promotores de crescimento aumentaram a altura das vilosidades intestinais quando associadas aos probióticos como *Bacillus subtilis*, enquanto que em associação com MOS e ácidos orgânicos ou apenas MOS e pool bacteriano quando usados individualmente não influenciaram.

Nunes et al. (2009) não observaram nenhuma diferença significativa na morfologia intestinal de frangos de corte suplementados com probióticos e prebióticos comparados aos tratamentos com antimicrobianos e controle.

Observou-se através das medições realizadas que não houve diferenças significativas na relação entre as vilosidades e cripta intestinais entre o controle negativo e o controle positivo ($p>0,05$), já para Borsoi (2009), que comparou a relação de vilo e cripta em aves desafiadas com *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* obteve menor relação vilo e cripta nos grupos desafiados se comparados ao grupo controle, sendo desafiadas as aves com a mesma quantidade de UFC/mL do presente estudo.

Nos tratamentos T3, T4 e T5, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as relações de comprimento das vilosidades/criptas intestinais. O que demonstra que os tratamentos não influenciaram no aumento de comprimento das vilosidades e

na redução da profundidade das criptas, fato observado por Salazar et al. (2008), que estudou os efeitos dos ácidos orgânicos (lático e butírico) sobre a morfometria intestinal de frangos de corte.

4.4 Avaliação das pesagens das aves

Realizou-se a pesagem das aves nos dias 0, 8, 15 e 22 dias, para acompanhamento do desempenho e respectivos tratamentos conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Peso médio(g) nas idades de 0, 8, 15 e 22 dias e tratamentos

Tratamentos	24 hs	8 dias	15 dias	22 dias
Controle negativo	48,5 ^a	246,45 ^a	521,26 ^d	1049,17 ^a
Controle positivo	45,5 ^a	233,69 ^a	577,27 ^b	1067,37 ^a
Probióticos	48,47 ^a	232,50 ^{ab}	525,30 ^d	1103,00 ^a
Ácidos Orgânicos	46,39 ^a	230,40 ^b	559,61 ^c	1163,00 ^a
Probióticos + Ác. orgânicos	47,41 ^a	237,26 ^a	597,23 ^a	1151,38 ^a
CV%	2,86	2,91	2,84	6,66
Valor de P	0,0356	0,0387	0,0001	0,1728

Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)-coluna.

Na pesagem do dia 0, não houve diferença significativa entre os tratamentos e os grupos controle.

No dia 8, o tratamento com ácidos orgânicos teve um peso significativamente menor que o controle negativo, diferença não encontrada nos demais tratamentos e controle positivo.

Aos 15 dias, o tratamento a base de probióticos e ácidos orgânicos apresentaram melhores resultados que os demais tratamentos em relação ao peso significativamente maior ($p > 0,05$) nesta idade avaliada.

No dia 22 não houve diferenças significativas entre todos os tratamentos e grupos controle. Resultados diferentes ocorreram no estudo de Salazar et al. (2008), na qual avaliou parâmetros de desempenho como peso e conversão alimentar em aves alimentadas com ácido lático e butírico adicionado às rações em que houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o controle.

Rossi et al. (2007), observaram que a maioria das publicações com desafios de *Salmonella* patogênica não apresentam diferenças significativas no desempenho zootécnico das aves, se comparados aos grupos controle sem desafio.

Rezende et al. (2008), avaliaram diferentes níveis de inclusão do ácido acético (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) em rações de frangos experimentalmente infectados com *Salmonella* e observaram que a inclusão do ácido acético em todos os níveis, melhorou os parâmetros zootécnicos (ganho de peso e conversão alimentar), mas com relação ao controle da contaminação por *Salmonella* não foi satisfatório.

Santos (2013), avaliou o peso médio de aves tratadas com diferentes probióticos com flora definida e indefinida e inoculação de *S. Enteritidis* não observou diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos.

Para Loddi (2003), que avaliou o efeito da inclusão de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus johnsonii*, *L. reuteri*, mananoligossacarídeo e lactose em dietas de frangos de corte, concluiu que não ocorreu ação isolada ou combinada dos probióticos no desempenho. Da mesma forma Rocha et al. (2010), concluíram que o uso de probióticos, ácidos orgânicos e prebióticos para frangos de corte não obtiveram resultados melhores em relação aos parâmetros de desempenho avaliados.

No entanto Nunes et al. (2009), comparando o desempenho de frangos tratados com probióticos e antimicrobianos, concluíram que o uso dos aditivos probióticos melhorou resultados semelhantes em ganho de peso nas aves. Vieira e Viola (2007), ao avaliarem a adição de ácidos orgânicos e inorgânicos em frangos de corte, não verificaram o efeito do uso destes sobre o ganho de peso e o consumo de ração.

4.5 Avaliação da capacidade de proteção dos tratamentos e desafio de SH

4.5.1 Índice de aves infectadas (fígados)

A quantidade de aves infectadas por SH pode ser demonstrada pelas Tabelas 6 e 7, de acordo com a quantidade de fígados contaminados e não contaminados.

No tratamento com desafio e probióticos e ácidos orgânicos (T5) houve significativo maior percentual de negativos em relação aos demais tratamentos,

sendo que no controle negativo (T1) todos os fígados testados foram negativos para SH.

Tabela 6 - Detecção de *Salmonella* Heidelberg nos fígados de aves, por isolamento bacteriano nos diferentes tratamentos. Resultados expressos em percentual de fígados contaminados e não contaminados.

Cultivo Microbiológico fígados		
Tratamentos	Negativo (%)	Positivo (%)
Controle negativo	100 ^a	0
Controle positivo	25 ^c	75
Positivo + probióticos	45 ^c	55
Positivo + ácidos orgânicos	62,5 ^{bc}	37,5
Positivo + ácidos + probióticos	72,5 ^b	27,5
Valor de P	<0,0001	

^{a b} Dois percentuais seguidos de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente ($P>0,05$) - coluna.

Os tratamentos com ácidos orgânicos (T4) e ácidos orgânicos e probióticos (T5) tiveram resultados semelhantes, não havendo diferença significativa ($p>0,05$) entre eles, sendo que ocorreu diferença significativa entre o tratamento 3 (probióticos e desafio), e os grupos controle.

Silva (2005), concluiu que os tratamentos com ácidos orgânicos nas concentrações de 30 kg/ton mostraram ser eficazes na inibição do crescimento de *Salmonella* sp. em rações avícolas após 24, 48 e 7 dias de contato com a ração contaminada.

Para Carvalho (2012), em um estudo com probióticos e desafio de *Salmonella* Enteritidis, não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) no que se refere a invasão dos órgãos internos por *S. Enteritidis* no fígado das aves desafiadas e o grupo controle aos 5 dias de idade. A Tabela 7 mostra o percentual de fígados contaminados por *Salmonella* Heidelberg no decorrer do período experimental.

Tabela 7 - Índice de aves infectadas (fígados) por *Salmonella* Heidelberg aos diferentes tratamentos. Resultados expressos em percentual de fígados contaminados.

Tratamentos	24h	8dias	15dias	22dias
Controle negativo	0 ^b	0 ^c	0 ^c	0 ^c
Controle positivo	25 ^a	20 ^a	15 ^a	15 ^a
Positivo + probióticos	12,5 ^a	12,5 ^{ab}	17,5 ^a	12,5 ^a
Positivo + ácidos orgânicos	12,5 ^a	10 ^{ab}	7,5 ^a	7,5 ^a
Positivo + ácidos + probióticos	10 ^a	5 ^{bc}	7,5 ^a	5 ^a
Valor de P	0.0172	0.0301	0.0622	0.1014

* Letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$)-coluna.

No transcorrer do período experimental todas as aves testadas do controle negativo (T1), foram negativas, ou seja, os fígados não apresentaram contaminação por SH. Nos demais tratamentos e controle positivo, tiveram percentuais de positividade para SH no decorrer do período testado, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos.

4.5.2 Índice de aves infectadas (suabe de cloaca)

A quantidade de aves infectadas por SH pode ser demonstrada pelas Tabelas 8 e 9, de acordo com a quantidade de fígados contaminados e não contaminados.

Tabela 8 - Detecção de SH nos suabes de cloaca por isolamento bacteriano nos diferentes tratamentos. Resultados expressos em percentual de suabes contaminados e não contaminados.

Tratamentos	Negativo(%)	Positivo(%)
Controle negativo	100 ^a	0
Controle positivo	62,5 ^c	37,5
Positivo +Probiótico	65 ^c	35
Positivo+Ácidos orgânicos	77,5 ^{bc}	22,5
Positivo + Ácidos orgânicos + Probiótico	87,5 ^b	12,5
Valor de P	0,001	

^{a b} Duas proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente $p > 0,05$ -coluna.

Demonstra-se que todas as amostras de suabe de cloaca do controle negativo foram negativas havendo diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos e controle positivo(Tabela 8).

Nos tratamentos com probióticos (T3) e controle positivo, não ocorreu diferença significativa com relação entre percentual de suabes de cloaca negativo (Tabela 8).

No tratamento com probióticos e ácidos orgânicos (T5), houve um maior percentual de suabe de cloaca negativo o que diferiu significativamente do tratamento com probióticos (T3) e controle positivo (T2). Essa diferença do tratamento com probióticos e ácidos orgânicos em relação aos demais tratamentos na redução de positividade de SH podendo ser sugerido algum efeito sinérgico entre os produtos.

Tabela 9 - Índice de aves infectadas (suabe de cloaca) por *Salmonella* Heidelberg aos diferentes tratamentos e idades. Resultados expressos em percentual de suabes contaminados.

Tratamentos	24h	8dias	15dias	22dias
Controle negativo	0	0	0	0
Controle positivo	15	10	7,5	5
Positivo + probióticos	12,5	7,5	7,5	7,5
Positivo + ácidos orgânicos	7,5	5	5	5
Positivo + ácidos + probióticos	5	2,5	5	0
Valor de P	0.1014	0.2613	0.5318	0.2551

Nos tratamentos com probióticos (T3) e controle positivo, não ocorreu diferença significativa com relação entre percentual de suabes de cloaca negativo (Tabela 8). Observa-se que no controle positivo, ocorreu redução do percentual de suabe de cloaca positivo no decorrer do período experimental, já no tratamento com ácidos orgânicos (T4), o percentual de suabes de cloaca positivos se manteve o mesmo apartir do dia 8 até o final do período avaliado.

No tratamento com ácidos e probióticos (T5), não houve suabes de cloaca contaminados com SH no dia 22, mesma situação encontrada no controle negativo (T1), o que vai de acordo com a Tabela 8, onde o tratamento 5, demonstrou-se mais eficiente com aumento significativo no percentual de negativos no último dia avaliado (dia 22). Resultados que podem sugerir um sinergismo entre o ácido e o probiótico na redução de suabes positivos no decorrer do estudo.

Lourenço et al.(2011), observaram que a adição de probióticos reduziu a quantidade de *Salmonella* Minnesota(SM) nos 7 dias após a inoculação em relação ao grupo controle positivo sem tratamento, mas que a redução não foi significativa nas 48 horas após a inoculação.

5 CONCLUSÕES

Os tratamentos com ácidos orgânicos (ácido acético, ácido butírico e ácido láctico), não influenciaram na contagem de *Salmonella* Heidelberg em aves de corte se comparado aos demais tratamentos.

O tratamento com probiótico (*Bacillus amyloliquefaciens*) reduziu a quantidade de *S. Heidelberg* no ingúvio das aves desafiadas ao final do experimento, mas não reduziu a quantidade de *S. Heidelberg* no ceco, o que pode ser devido ao tempo de tratamento não ser suficiente ao ponto de reduzir significativamente a contagem de *S. Heidelberg*.

A associação de ácidos orgânicos e probiótico, reduziu a quantidade de aves contaminadas com *S. Heidelberg*, desta forma probiótico (*Bacillus amyloliquefaciens* e ácidos orgânicos (acético, butírico, láctico) administrados simultaneamente podem significar uma ferramenta adicional no controle de *S. Heidelberg*.

Os tratamentos com ácidos e probióticos não alteraram a morfometria das vilosidades e criptas intestinais. O sucesso no controle de *S. Heidelberg* não depende unicamente de uma ação, como a administração de um produto, por exemplo, mas da associação de várias medidas, incluindo biossegurança, controle de pragas em todo o setor de produção, além do uso de outras alternativas como probióticos e ácidos orgânicos durante toda a fase de produção.

6 REFERÊNCIAS

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAS) no estado do Paraná-Brasil, no período de 1987 a 2000. **Ciênc Agrotéc**, Lavras, v. 30, n. 6, 2006.

ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; CURI, P. R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 49, p. 661-62, 1999.

ARISTIDES, L. G. A. **Inibição do desenvolvimento de carnes PSE (Pale, Soft exudative) e de *Salmonella* Spp. em frangos de corte pelo uso de probióticos e simbióticos.** 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

AVILA, L. A. F.; NASCIMENTO, V. P.; CANAL, C. W.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. Effect of Acidified Drinking Water and Recover of *Salmonella* enteritidis from Broiler Crops. **Brazilian J. Poultry Sci.**, Campinas, v. 5, n. 3, p. 183-188, 2003.

BACK, A. Paralelo entre a ocorrência de pulorose, tifo e paratifo aviário e os métodos para monitoria e diagnóstico. **Avisite**, São Paulo, v.80, p.29, 2014.

BASSAN, J. D. L.; FLORES, M. L.; ANTONIAZZI, T.; BIANCHI, E.; KUTTEL, J.; FELIN, M. Avaliação de dois ácidos orgânicos incorporados em um carrier mineral no controle da infecção por *Salmonella* enteritidis em frangos de corte. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 203, 2006.

BASSAN, J. D. L.; FLORES, L. M.; ANTONIAZZI, T.; BIANCHI T.; KUTTEL, J.; TRINDADE, M. M. Controle de infecção por *Salmonella* enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeos. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p.1961- 1965, 2008.

BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and anthagonistic interation with *Bacillus amyloliquefaciens*.** 1993. 157 f. Tese (Doutorado) - University of Strathclyde. Glasgow, 1993.

BENITEZ, L. B. Caracterização de peptídeos antimicrobianos de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antibacteriana, antifúngica e amebicida. 2010. 169f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BETTCHER, D. W.; YACH, D.; GUINDON, G. E. Global trade e health: key linkages and future challenges. **World Health Org.**, United Nations, v. 78, p. 521-534, 2000.

BIDOL, S. A.; DALY, E. R.; RICKERT, R. E.; HILL, T. A.; AL KHALDI, S.; TAYLOR JR., T. H.; LYNCH, M. F.; PAINTER, J. A.; BRADEN, C. R.; YU, P. A.; DEMMA, L.; BEHRAVESH, C. BARTON; OLSON, C. K.; GREENE, S. K.; SCHMITZ, A. M.; BLANEY, D. D.; GERSHMAN, M. Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants. **MMWR**, United States, v. 56, p. 909-911, 2005-2006.

BIGGS, P.; PARSONS, C. M. The effects of several organic acids on growth, performance, nutrient of digestibilities and cecal microbial population in young chickens. **Poultry Sci**, Champaign, v. 87, p. 2581-2589, 2008.

BRACEY, D.; HOLYOAK, C. D.; COOTE, P. J. Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition depend on reduced intracellular pH? **Appl. Microbiol.**, New York, v.85, p.1056-1066, 1998.

BORSOI, A. **Inoculação de *Salmonella heidelberg* e *Salmonella enteritidis* em pintos de corte para a avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de *Salmonella enteritidis***. 2009. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BOYD, E. F.; WANG, F. S.; WHITHAM, T. S.; SELANDER, R. K. Molecular relationship of salmonellae. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, p. 804-808, 1996.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on gram-positive bacteria. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 16, n. 2, p.175-188, 2003.

CALAÇA, G. M. **Ácidos orgânicos no controle de *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella Enteritidis* e *Eimeria tenella***. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

CAMPBELL, L. L.; WELKER, N. E. Comparison of the α -Amylase of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **J Microbiol**, Korea, v. 94, n. 4, p. 1131-1135, 1967.

CARTER, G.R. Enterobacteriaceae. In: CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. Livraria Roca, São Paulo, p.144-154, 1988.

CARVALHO, H. E. **Probióticos de culturas definidas e indefinidas no controle de *Salmonella enteritidis* de frangos de corte**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2012.

CASTRO, B. S.; SALLES, R. P. R.; TEIXEIRA, R. S. C.; SIQUEIRA, A. A.; SILVA, E. E.; CARDOSO, W. M. Monitoramento bacteriológico para *Salmonella* Spp. em poedeira comercial na recria e produção de empresas avícolas da região metropolitana de Fortaleza, CE, Brasil. **Ciênc Anim Bras**, Goiânia, v. 9, n. 2, p. 427-432, 2008.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**: multistate outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to foster farm brand chicken. Disponível em :<<http://www.cdc.gov/Salmonella/Heidelberg>>. Acesso em: 25 mai. 2014.

CFMV. **Conselho Federal de Medicina Veterinária**: Resolução nº1000, 11 de maio de 2002. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/resolucao_1000> Acesso em 10 de junho de 2014.

CHAMBERS, J. R.; BISAILLON, J. R.; LABBÉ, Y.; POPPE, C.; LANGFORD, C. F. Salmonella prevalence in crops of Ontario and Quebec broiler chickens slaughter. **Poultry Sci**, Champain, v. 77, p. 1497-1501, 1998.

CHERNAK L.A.M., BIESDORF, S.M., ALMEIDA, L.M., LEFFER, E.V.B., VIGNE, B. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas, v.4, n.3, 2002.

CHERRINGTON, C. A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Organic Acids: Chemistry antibacterial activity and practical application. **Adv Microbiol Phisiol**, Shiffield, UK, v. 32, p. 87-108, 1991.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R. V.; FRY, A. M. Summary of National Reports of foodborn outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease presentation. **J Food Prot**, Des Moines, USA, v. 69, n. 5, p. 1150-1153, 2006.

COLLA, L. F.; RODRIGUES, B. L.; BORSOI, A.; DICKEL, L. E.; NASCIMENTO, P. V.; SANTOS, R. L. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos de abate de frangos de corte. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v. 79, n. 4, 2012.

COPPOLA, M. M.; TURNES, G. C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004.

CROSS, L. M. Microbes versus microbes immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens FEMS. **Immunol Med Microbiol**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

DIBNER; BUTIN, 2002

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

EKLUND, T. The effect of sorbic acid end esters of para-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicle. **J Gen Microbiol**, London, v. 131, p. 73-76, 1985.

EWING, W. H. Edward's e Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. **Intern J Syst Bacteriol**, Washington, v. 36, n. 4, p. 581-582, out. 1986.

FERREIRA, A. A.; NATALI, M. R.; DELANI, T. C. O.; MARTINS, R. M.; PRESTES, T. S. Papel do sistema imune e atuação dos pro bióticos na doença de Crohn. **Arq Ciênc e Saúde**, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 171-177, 2010.

FLOWERES, F.L. Salmonella. Food Technology. v.4, n.42, p 182-185, 1988.

FOLEY, S.L., LYNNE, A.M. Food animal-associated Salmonella challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p.173-187, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. NARMS retail meat annual report, 2010. Rockville. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/mmwr>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

FOX, S. M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. Vet Med, Prague, v. 83, n. 8, p. 806-829, 1988.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. Atheneu: São Paulo, 1996. 182p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, UK, v. 66, p.365-378, 1989.

GAST, R. K.; PORTER JR, R.E.; HOLT, P.S. Applying tests specific yolk antibodies to predict contamination by Salmonella enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. **Avian Dis**, Jacksonville, v. 41, n. 1, p. 195-202, 2007.

GAST, K. R. **Salmonella Infections**. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (eds.). Disease of Poultry, 11.ed. Iowa: Iowa State Press. 2003. p. 567-614.

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

HIRADATE, S.; YOSHIDA, S.; SUGIE, H.; YADA, H.; FUJII, Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. **Phytochemistry**, New York, v. 61, p.693-698, 2002.

HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P. H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, A. S. Characterization of Bacillus species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 66, n.12, p. 5241-5247, 2000.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves do Brasil. **Pesq Vet Bras**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.

HOLT, J.G. **Manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Willians, 1994. p.187.

ISLAM, V. I. H.; BABU, N. P.; PANDIKUMAR, P.; IGNACIMUTHU, S. Isolation and characterization of putative probiotic bacterial strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from north east Himalayan soil based on in vitro and in vivo function properties. **Probiotics Antimicrob Proteins**, New York, v. 3, n. 3, p. 175-185, 2011.

JIAN, J.; LAN, H. U. S.; CUI, Z. W.; LI, W. F. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* mediate M1 macrophage polarization in mouse marrow bone-derived macrophage. **Arq Microbiol**, New York, v. 195, n. 5, p. 349-356, 2013.

JUNEJA, V. K.; MELENDRES, M. V.; HUANG, L.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H.; Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditional from 10 to 45°C. **Int J Microbiol**, Cairo, v. 31, p.106-111, 2009.

KNUDSEN, D. E.; SERENA, A.; CANIBE, N.; JUNTENEN, K. S. New insight into butirate metabolism. **Proceed Nut Society**, Cambridge, v. 61, p. 81-86, 2003.

KONEMAN, K. L.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. R. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997. 1395p.

LANCINI, J.B. Fatores exógenos na função gastrointestinal. In: Curso da fisiologia da digestão e absorção de aves. 1992. Santos. **Anais...** Santos: FACTA. 1992. p.1-33.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de frangos de aves: uma visão da indústria e recentes avanços. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 2005. Santos. **Anais...** Santos: FACTA. 2005. p.25

LEANDRO, N.S.M.; OLIVEIRA, A.S.C.; CAFÉ, M.B.; GONZALES, E.; STRINGHINI, J.H.; CARVALHO, F.B.; ANDRADE, M.A. Efeito do prebiótico e do ácido butírico in ovo sobre o desempenho, digestibilidade dos nutrientes da ração e biometria do trato gastrointestinal de pintos submetidos ao jejum. **Cienc Anim Bras**, Goiânia, v. 11, n. 4, 2010.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors proced by microorganisms. **Science**, Washington, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIMA, E. T. **Uso de prebiótico e probiótico em frangos de corte infectados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e detecção de genes codificadores de bacteriocinas em *Lactobacillus salivarius***. 2008. 60 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

LISBOA, M. P. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isoladas do solo**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LODDI, M.M. **Probióticos, prebióticos e acidificantes orgânicos em dietas para frangos de corte**. 2003. 52 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

LORENÇO, M. C.; KURITZA, L. N.; WESPHAL, P.; MIGLINO, L. B.; PICKLER, L.; KRAIESKI, A. L.; SANTIN, E. Uso de probióticos sobre a ativação das células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesq Bras Vet**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 11-14, 2013.

MACARI, M.; FURLAN, L. R. Probióticos. In: Conferência Apinco de Ciências e tecnologia Avícolas. 2005. Santos, **Anais...** Santos: São Paulo. v. 1, p. 53-71, 2005.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M.; ALMEIDA, J. G.; MACARI, M. Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. **Rev Bras Ciênc Avíc**, Campinas, v. 3, n. 1, 2001.

MALLINSON, E. T.; SNOEYENBOS, G. H. Salmonellosis. In: PURCHASE, H.G. **A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. Kennett Square: University of Pennsylvania, The American Avian Pathologists. 1989. p.3-11.

MENDONÇA, P. E. **Disseminação de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva do frango de corte**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Uberlândia. 2011.

MOREIRA, O. P. A. **Pesquisa de *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade da região metropolitana de Fortaleza-CE**. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2002.

MURRAY, R. H.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. M. **Harper's biochemistry**. 22.ed. New York: Worth Publishers, 1990. p.720.

NASCIMENTO, J. M. C. **Salmoneloses: avaliação epidemiológica, clínica laboratorial do instituto de infectologia Emílio Ribas com infecção por *Salmonella* Spp., no período de janeiro de 1992 a dezembro de 2002**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, 2007.

NOGUEIRA, M.G. **Avaliação de probióticos e de bacteriófagos lícitos para o controle de *Salmonella* sp. em suínos experimentalmente infectados**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

NUNES, A. D.; VAZ, A. C. N.; RASPANTINI, L. E.; SILVA, E. M.; ALBUQUERQUE, R. Performance and intestinal morphology of broilers of cut fed with rations containing alternative additive instead of antimicrobials. **Braz J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 500-506, 2009.

OLIVEIRA, W. F.; CARDOSO, W. M.; SALLES, R. P. R.; ROMÃO, J. M.; TEIXEIRA, R. S. C.; CAMARA, S.R.; SIQUEIRA, A. A.; MARQUES, L. C. L. Initial identification and sensitivity to antimicrobial agents of *Salmonella* sp. isolated from poultry products in the state of Ceara, Brazil. **Braz J Poultry Sci**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 193-199, 2006.

OSTERMANN, et al. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. In: **Ave World**: Revista do Agricultor Moderno. São Paulo: Animal World, ano 3, n.15, abril/maio, p.28-31, 2005.

PELICANO, E. R. L. **Desempenho, qualidade de carcaça e morfologia intestinal de frangos de corte alimentados com dietas diferentes princípios ativos de probióticos**. 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2002.

PELICANO, E.R.L., SOUZA, P.A., SOUZA, H.B.A., FIGUEIREDO, D.F., AMARAL, C.M.C.. Morphometry and ultra-structure of intestinal mucosa of broilers fed different additives. **Braz J Poultry Sci**, Campinas, v. 9, n. 3, p.173-180, 2007.

PENZ, A.M.; SILVA, A.B.; RODRIGUES, O. Ácidos Orgânicos na Alimentação de Aves. In: Conferência Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas. 1993. Porto Alegre. **Anais...** Campinas: FACTA, 1993. p. 111-119.

PICKLER, L. **Ácidos orgânicos via água e via ração para controlar *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e Minnesota em frangos de corte**. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PICKLER, L.; MIGLINO, B. L.; CARON, F. L.; BEIRÃO, B. C. B.; SILVA, F. V.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesq Vet Bras**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2012.

POPPE, C.; DUNCAN, C. L.; MAZZOCO, A. *Salmonella* contamination of hatching and table eggs: comparison. **Canadian J Vet Res**, Ottawa, v. 62, n. , p.191-198, 1998.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L. A.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **Int J Syst Bacteriol**, Czech Republic, v. 37, n. 1, p. 69-71, 1987.

PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriology reviews*. **Microbiol Mol Biol Rev**, Washington, v. 41, n. 3, p. 711-753, 1977.

RAGHIANTE, F.; ROCHA, T. S.; ROSSI, D. A.; SILVA, P. L. Penetration time of *Salmonella* Heidelberg through shells of white and brown commercial eggs. **Braz J Poultry Sci**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 273-277, 2010.

REZENDE, C. S.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LINHARES, G. F. C.; MESQUITA, A. Q.; MINAFRA, C. S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Ver Port Ciênc Vet**, Lisboa, v. 100, p. 199-203, 2005.

REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; STRINCHINI, 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. **Rev Bras Saúde Prod Anim**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 516-528, 2008.

ROCHA, A. P.; ABREU, R. D.; COSTA, M. C. M.; OLIVEIRA, G. J. C.; ALBINATI, R. C. B.; PAZ, A. S.; QUEIROZ, L. G.; PEDREIRA, T. M. Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações para frangos de corte. **Rev Bras Saúde Prod Anim**, Salvador, v. 11, n. 3, p. 793-801, 2010.

ROCHA, P. T.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LOULY, P. R.; NASCIMENTO, M. N. *Salmonella* Spp em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arq Bras Vet Zootec**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, 2003.

RODRIGUES, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, Anais..., Santos, p.223-237, 2005.

ROSSI, A. A.; PADILHA, M. T. S.; SANTOS, I. I.; PADILHA, J. C. F. Uso de probióticos na prevenção de salmoneloses em frangos de corte. **Ciênc Agrotéc**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1207-1211, 2007.

RUSSEL, M. S. **Controlando *Salmonella* na produção e processamento de aves**. Broken Sound Parkway: CRC press..4 ed. 289p. 2012.

SALAZAR, R. C. P.; ALBUQUERQUE, R.; TAKEARA, P.; TRINDADE, A. M.; ARAÚJO, F. L. Efeito dos ácidos láctico e butírico, isolados e associados, sobre o desempenho e morfometria intestinal em frangos de corte. **Braz J Vet**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 463-471, 2008.

SALMINEN, S. et al. Clinical applications of probiotic. **Int Dairy J**, Amsterdam, v. 8, p.563-572, 1998.

SANTOS, D.M.S., JUNIOR, B.A., FERNANDES, A.S., TAVECHIO, T.A., AMARAL, A.L. *Salmonella* em carcaças de frangos congeladas. **Pesq.Vet.Bras**.v.20,n.1,Rio de Janeiro, 2000.

SANTOS, G. R. J. **Probióticos e simbiótico sobre desempenho zootécnico e morfometria intestinal de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis**. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2013.

SANTOS, G. R. J.; TURNES, G. C. Probióticos em avicultura. **Ciênc Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT software**:changes and enhancements release 6.07.Cary: Statistical Analysis Institute. The MIXED procedure. (SAS technical Report, p.229, 1992.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A. Foodborne illness acquired in the United States- major pathogens. **Emerg Infect Dis**, Atlanta,v. 17, p. 7-15, 2011.

SCHREZENMEIR, J., DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American J Clin Nutr**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 361-364, 2001.

SERVIN, A. L.; COCONNIER, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interation with pathogens. **Best Practice Res Clin Gastroenterol**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 741-754, 2003.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, S. M. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* Spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciênc Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, 2008.

SILVA, E. M.; DUARTE, A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev Bras Ciênc Avíc**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, L. C. C. Avaliação de um ácido orgânico como um agente inibidor do crescimento de *Salmonella sp.* em rações de aves. **Braz J Poultry Sci**, Campinas, n. 7, p. 219, 2005.

SIMÕES, R. S. [vários títulos], 2014. 2 fotografias.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The genus bacillus - nonmedical. In: BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARPER, W.; SCHLEIFER, K. H. (eds.). **The Prokaryotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 1687-1688.

SPAGNOL, C.; KELLERMANN, A.; AVILA, L. F.; NASCIMENTO, V. P. **Efeito da adição de ácidos orgânicos sobre o nível de contaminação por *Salmonella* Enteritidis no Inglúvio de frangos de corte**. Livro de Resumos. Porto Alegre: UFRGS. v. 14, p.2-6,2002.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. **Mol Microbiol**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 845-847, 2005.

STERZO, V. E.; VARZONE, M. R. J.; FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaio e Ciência**: Ciências biológicas, agrárias e da saúde, Anhanguera, v. 12, n. 2, p. 129-138. 2008.

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 classical weak- acid theory. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.136, p.37-43, 2009.

SZABÓ, I, WIELER, L.H., TEDIN, K., TEDIN, L.S., TARAS, D. HENSEL, A., APPEL, B., NÖCKLER, K. Influence of probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 75, n. 9, p. 2621-2628, 2009.

TAITT, C. R.; SHUBIN, Y. S.; ANGEL, R. Detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by using a rapid array based immunosensor. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 70, n. 1, p. 152-158, 2004.

TELLEZ, G.; MENCONI, A.; REGINATTO, A. R.; LONDERO, A.; PUMFORD, N. R.; MORGAN, M.; HARGIS, B. M. Effect of organic acids on Salmonella Typhimurium infection in Broiler Chickens. **Int J Poultry Sci**, Pakistan, v. 12, n. 2, p. 72-75, 2013.

TESSARI, E.N.C.,CARDOSO, A.L.S.P., CASTRO, A.G.M. Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo,v.70, n.3, p.279-281, 2003.

TESSARI, C. N. E.; CARDOSO, P. S. L. A.; KANASHIRO, I. M. A.; STOPPA, Z. F. G.; LUCIANO, L. R.; CASTRO, M. G. A. Ocorrência de *Salmonella* Spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do estado de São Paulo, Brasil. **Ciênc Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, 2008.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. **História da avicultura no Brasil, 2014**. Disponível em:<<http://www.ubabef.com.br>>. Acesso em: 31 maio 2014.

UTIYAMA, C. E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extra tos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém desmamados**. 2004. 110 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VAN DUIJKEREN, E.; WANNET, W. J. B.; HOUWERS, D. J.; VAN PELT, W. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs and chickens in the Netherlands from 1984-2001. **J Clin Microbiol**, Washington,v. 41, n. 3, p. 574-578, 2003.

VANN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Interactions of Butyric Acid and Acetic Acid Treated Salmonella with Chicken Primary Cecal Epithelial Cells In Vitro. **Avian Dis**, Jacksonville, v. 48, p. 384-391, 2004.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, L. S. Suplementação de ácidos orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Rev Bras Zootec**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1097-1104, 2007.

WÄCHTERS HÄUSER, A. Rationale for the luminal provision of butirato in intestinal diseases. **Eur J Nutr**, London, v. 39, p. 164-171, 2000.

WELKER, N. E.; CAMPBELL, L. L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, Baltimore, v. 94, p. 1124-1130, 1967.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Biological Control**, San Diego, v. 91, n. 2, p. 27-33, 2001.