

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
TÂNIA DELLO MONACO MARTINS BONA



**AVALIAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO,
ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NO
CONTROLE DE *SALMONELLA*, *EIMEIRIA* E *CLOSTRIDIUM*
EM FRANGOS DE CORTE**

CURITIBA
2010

TÂNIA DELLO MONACO MARTINS BONA



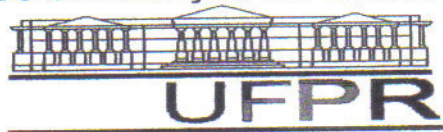
**AVALIAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO,
ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NO
CONTROLE DE *SALMONELLA*, *EIMEIRIA* E *CLOSTRIDIUM*
EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de Concentração:
Patologia, Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Santin

CURITIBA
2010

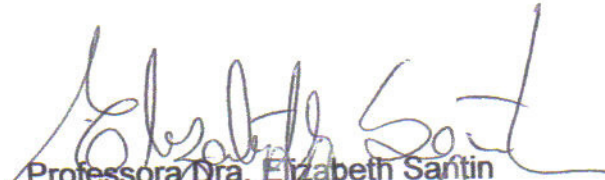
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

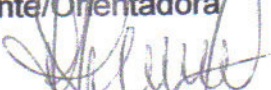


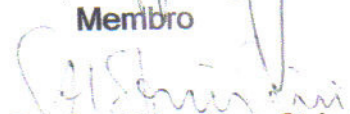
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“AVALIAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NO CONTROLE DE SALMONELLA, EIMEIRIA E CLOSTRIDIUM EM FRANGOS DE CORTE”** apresentada pela Mestranda **TÂNIA DELLO MONACO MARTINS BONA** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata Aprovada para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 19 de fevereiro de 2010


Professora Dra. Elizabeth Santin
Presidente/Orientadora


Professor Dr. José Sidney Flemming
Membro


Professor Dr. José Henrique Stringhini
Membro

Dedicatória

Dedico este trabalho a meu querido esposo, meus pais, meu irmão e à minha irmã, que mesmo não estando presente entre nós sempre me deu forças para batalhar cada vez mais. Dedico também a todos os amigos do Labmor, que muito me ajudaram em vários momentos; e é claro a minha orientadora, Elizabeth Santin, que não foi apenas uma orientadora de mestrado, mas também me mostrou outra perspectiva da vida profissional. Muito Obrigada a TODOS!

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>VII</u>
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<u>VIII</u>
<u>RESUMO</u>	<u>IX</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>X</u>
<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	<u>11</u>
REFERÊNCIAS	16
<u>CAPÍTULO 1.....</u>	<u>19</u>
<u>ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NA DIETA FRANGOS DE CORTE PARA O CONTROLE DE EIMERIOSES E CLOSTRIDIOSE</u>	<u>20</u>
RESUMO	20
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	32
<u>CAPÍTULO 2.....</u>	<u>36</u>
<u>ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE PARA O CONTROLE DE SALMONELLA ENTERITIDIS</u>	<u>37</u>
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
ANIMAIS.....	40
INOCULAÇÃO DE SALMONELLA	41

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	41
NECROPSIA	42
ANÁLISES HISTOLÓGICAS	43
IMUNO-HISTOQUÍMICA	43
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	54
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>56</u>

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1 – Representação do Log10 de colônias de *Salmonella* 72h após a inoculação de 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis em aves de 21 dias de idade em comparação à relação vilo/células CD3⁺. 48
- Figura 2 – Eletromicrografia de varredura da superfície da mucosa do íleo de aves com 24 dias de idade desafiadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis submetidas a diferentes tratamentos na alimentação: A) grupo controle, superfície com espesso muco e fímbrias de bactérias aderidas ao epitélio; B) aproximação da superfície mucosa (X350) de ave do grupo controle apresentando fímbrias aderidas; C) grupo alimentado com dieta com Avilamicina apresentando pouco muco e sem fímbrias aderidas; D) grupo alimentado com composto vegetal a base de óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta, apresentando muco moderado e algumas fímbrias aderidas ao epitélio (figuras A, C, D: X 200; B: X 350). 49
- Figura 3 – Eletromicrografia de varredura da superfície da mucosa do ceco de aves com 24 dias de idade desafiadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis submetidas a diferentes tratamentos na alimentação: A) grupo controle, superfície apresentando espessa camada de muco; B) (X 3.500) grupo controle, aproximação mostrando estrutura de bastonetes aderidos à mucosa; C) grupo alimentado com dieta com Avilamicina apresentando pouco muco; D) grupo alimentado com dieta com composto vegetal a base de óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta, superfície mostrando mucosa limpa. (figuras A, C, D: X 200; B: X 3.500). 50

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Mediana de escores de lesões específicas de coccidioses no trato gastrointestinal observadas na necropsia de 18 frangos aos 22 dias de idade (sete dias após a inoculação de eimerias) ($P>0,05$).	27
Tabela 2 – Mediana de escores de lesões específicas de coccidiose no trato gastrointestinal observadas na necropsia de 18 frangos aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação de eimerias).	28
Tabela 3 – Média dos resultados de contagem de colônias de <i>Clostridium perfringens</i> (Log ₁₀ UFC/g) de conteúdo cecal de 6 frangos por tratamento aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação de eimérias) ($P<0,0001$).	29

Capítulo 2

Tabela 1 – Contagem de colônias de <i>Salmonella</i> observadas em suabe de cloaca de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC de <i>Salmonella</i> Enteritidis 24, 48 e 72 horas após a inoculação (PI) (Média \pm Desvio Padrão dos valores expressos em Log ₁₀).....	45
Tabela 2 – Avaliações em microscopia ótica de fragmentos de duodeno de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC <i>Salmonella</i> Enteritidis (Média \pm Desvio Padrão).	46
Tabela 3 – Avaliações em microscopia ótica de fragmentos de íleo de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC <i>Salmonella</i> Enteritidis (Média \pm Desvio Padrão).	47
Tabela 4 – Avaliações em microscopia ótica de fragmentos de ceco de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC <i>Salmonella</i> Enteritidis (Média \pm Desvio Padrão).....	48

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a eficiência de um composto vegetal contendo óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. Para tal, foram realizados dois experimentos. No primeiro avaliou-se a eficiência deste produto no controle de *Clostridium perfringens* após desafio com *Eimeria acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. Aves de um dia de idade foram divididas em três grupos: T1 – dieta controle sem aditivo promotor de crescimento; T2 – dieta com adição de avilamicina (10 ppm); e T3 – dieta com adição do composto vegetal (100 ppm). O uso do composto vegetal na alimentação de frangos reduziu lesões específicas de *E. maxima* e *E. tenella* aos 14 dias pós-inoculação (PI) como também reduziram a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Clostridium perfringens* no conteúdo do ceco das aves em relação ao grupo controle. No segundo experimento avaliou-se a eficiência deste mesmo produto em aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. Aves de um dia de idade foram distribuídas em três tratamentos, sendo T1 – dieta controle sem adição de antibiótico promotor de crescimento, T2 – dieta com 10 ppm de Avilamicina, T3 – dieta com 100 ppm de um produto a base do composto vegetal acima citado. Aos 21 dias de idade todas as aves foram inoculadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis. A utilização do composto vegetal e avilamicina diminuiu a excreção de *Salmonella* nas aves 72 horas PI de *Salmonella*. A utilização do composto vegetal aumentou a relação vilo/células CD3⁺ no duodeno, em relação ao grupo avilamicina e controle, porém não teve efeito sobre a expressão destas células no ceco.

Palavras-chaves: *Clostridium*, *Eimeria*, extrato de ervas, óleos essenciais, *Salmonella*.

ABSTRACT

The efficiency of a product in broiler feed containing essential oil of oregano, rosemary, cinnamon and extract of red pepper (plant compost) in the control of *Salmonella*, *Eimeria* and *Clostridium* was evaluated. Two experiments were carried out to evaluate the product. In the first experiment the efficiency of this product to control *Clostridium perfringens* after challenge with *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* was assessed. Day old chicks were allotted into three groups: T1 – control diet without growth promoter, T2 – diet with avilamycin (10 ppm), and T3 – diet with addition of the plant compost (100 ppm). The use of the plant compost in broiler diets reduced specific lesions of *E. maxima* and *E. tenella* at 14 days after inoculation and reduced the count of colony forming units (CFU) of *Clostridium perfringens* in the ceca comparing to the control group. In the second trial the efficiency of the same product in birds challenged with *Salmonella* Enteritidis was evaluated. Day old birds were submitted to three experimental diets: T1 – control diet without antibiotics growth promoter, T2 – diet with 10 ppm Avilamycin, T3 – diet with 100 ppm of the plant compost mentioned above. At 21 days of age all birds were inoculated with 10^5 CFU of *Salmonella* Enteritidis. The use of the plant compost and avilamycin decreased the excretion of *Salmonella* in poultry 72 hours after the inoculation. The use of the plant compost increased villous / CD3⁺ cells in the duodenum, compared to group avilamycin and control, but had no effect on the expression of these cells in the cecum.

Key-words: *Clostridium*, *Eimeria*, essential oils, herb extracts, *Salmonella*.

INTRODUÇÃO GERAL

Em consequência da ampla distribuição bacteriana no intestino, desde a década de 50, antibióticos têm sido incorporados na ração animal, devido ao benéfico e vantajoso efeito no desenvolvimento ponderal de aves e suínos. Esta prática consolidou-se e os antimicrobianos passaram a ser chamados de promotores de crescimento, porque reduzem a morbidade e a mortalidade causadas por doenças clínicas e subclínicas e, também, incrementam a conversão alimentar, favorecendo o crescimento e promovendo melhoras nos índices zootécnicos em animais criados sob condições cada vez mais intensivas. O uso de antibióticos como profiláticos ou como promotores de crescimento na alimentação animal também reduz o isolamento de patógenos na carne de aves.

Desta forma, os antimicrobianos contribuíram para a expansão da avicultura e da suinocultura, atingindo patamares capazes de influenciar a balança comercial dos países produtores (Menten, 2001). Mais recentemente, entretanto, o amplo uso destes agentes tem sido alvo de restrições (Butaye et al., 2003; Brugali, 2003). Em 1997, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório sugerindo a ligação entre os antibióticos usados na alimentação destes animais e o aumento da resistência antimicrobiana no homem (World Health Organization, 1997). Em 2000, outro relatório recomendava que fosse banido o uso dos antibióticos promotores de crescimento de mesma classe dos usados em seres humanos (World Health Organization, 2000). Sendo assim, a partir de janeiro de 2006, a União Européia proibiu o uso de qualquer tipo de antibiótico e quimioterápico como promotor de crescimento na produção animal, que eram vistos como fatores de risco para a saúde pública pelo seu eventual papel na ocorrência de resistência microbiana.

Tais regulamentações têm forçado a busca de alternativas que garantam o máximo crescimento dos animais sem afetar a qualidade do produto final. As principais alternativas que têm sido pesquisadas incluem prebióticos, probióticos, enzimas, ácidos orgânicos, óleos essenciais e extratos vegetais (Miltenburg, 2000; Jeauround et al., 2002).

A utilização de plantas como medicamentos acompanhou o processo civilizatório de maneira especial e ainda representa uma fonte de recursos à moderna farmacologia. A inclusão de extratos vegetais às rações animais requer ausência de toxicidade e assim os óleos essenciais de vegetais, tradicionalmente utilizados como condimentos ou temperos, enquandram-se neste fim, agora, com renovado interesse (Brugali, 2003).

Extratos vegetais são provenientes de produtos vegetais, isolados ou em misturas isentas de matérias estranhas, utilizados como temperos, flavorizantes e aromatizantes de alimentos (Peter, 2001). Segundo a Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007 – Anvisa, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados, por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (Brasil, 2007).

Os componentes dos óleos essenciais são produzidos pelo metabolismo secundário da planta, sendo que sua produção nem sempre é necessária para que a planta complete seu ciclo de vida, porém desempenham um importante papel na

interação das plantas com o meio ambiente, possuindo um papel de defesa contra patógenos ou proteção contra fatores estressantes como mudanças de temperatura, luz, raios ultravioletas ou deficiências nutricionais (Peres, 2009).

Por esse motivo a composição e a concentração dos constituintes metabólicos secundários de uma planta podem variar conforme a espécie vegetal, as condições climáticas durante o seu desenvolvimento, a procedência da planta, o tipo de extração e as condições de armazenamento (Jansen et al., 1986).

Segundo Kamel (2000), os efeitos positivos dos extratos vegetais estão associados aos seus princípios ativos e compostos secundários. Princípios ativos são componentes químicos, presentes em todas as partes das plantas ou em áreas específicas que conferem as plantas medicinais alguma atividade terapêutica (Martins et al., 2000).

A substância que constitui o princípio ativo de um óleo essencial pode ser encontrada em diversas plantas, às vezes em concentrações diferentes. O timol pode ser encontrado no óleo essencial de tomilho (41%) e no óleo essencial de orégano (10%), porém só pode ser considerado princípio ativo do tomilho, sendo que o princípio ativo do orégano é o carvacrol, presente em 60% do óleo (Kamel, 2000).

Não se conhece exatamente o mecanismo de ação dos óleos essenciais, porém acredita-se que a maioria deles exerce efeito microbiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática por íons de hidrogênio e potássio, causando a interrupção dos processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, o que resulta em perda do controle quimiosmótico da célula afetada, levando a morte bacteriana (Dorman e Deans, 2000).

A alteração da permeabilidade da membrana das paredes celulares das bactérias se deve ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas. As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos, formando uma superfície hidrofílica. Este caráter hidrofílico cria uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas como óleos essenciais, explicando a resistência de bactérias Gram-negativas aos óleos essenciais. (Dorman e Deans, 2000).

Quando utilizados na alimentação animal, os princípios ativos dos extratos vegetais são absorvidos no intestino pelos enterócitos e metabolizados rapidamente no organismo. Os produtos deste metabolismo são transformados em compostos polares, através da conjugação com glicuronatos, e excretados na urina. Outros princípios ainda podem ser eliminados pela respiração como CO₂. A rápida metabolização e curta meia-vida dos compostos ativos levam a crer que existe um risco mínimo de acúmulo nos tecidos. (Kohlert et al, 2000).

Extratos de ervas e óleos essenciais têm sido ao longo da história da humanidade relacionado com a resistência a doenças. Apesar disso o mecanismo de ação tem sido bastante questionado na medicina moderna. Ainda não está completamente definido se estes aditivos atuam sobre os patógenos especificamente ou tem ação imunomoduladora tornando os animais e pessoas resistentes a infecções. De qualquer maneira maiores estudos são necessários nesta área para melhor compreender seu mecanismo de ação no controle de enfermidades.

São recentes os estudos científicos com plantas ou mesmo seus metabólitos secundários para fins terapêuticos, profiláticos ou como melhoradores do desempenho de animais. No entanto, as recentes restrições ao uso de antibióticos melhoradores do desempenho na produção animal têm incentivado a busca por aditivos alternativos.

Neste sentido, cresce em importância a possibilidade de exploração do potencial antimicrobiano, bem como de outras propriedades, das plantas e de seus respectivos constituintes.

No âmbito do consumo de rações destinadas à avicultura e suinocultura, há nítida preocupação pela substituição dos antibacterianos, denominados promotores de crescimento, por agentes não menos efetivos, mas de origem natural (Miltenburg, 2000; Menten, 2001). As plantas estudadas e empregadas atualmente na nutrição animal são a canela e o cravo (melhoram o apetite e a digestão), orégano (propriedades antimicrobianas), e a pimenta vermelha (potencial antidiarréico e anti-inflamatório) (Kamel, 2000). Os óleos essenciais extraídos de orégano, do tomilho, da canela, entre outros, têm potencial antimicrobiano significativo (Burt, 2004; Jearound et al., 2002; Kalemba e Kunicka, 2003); todavia, a maioria das publicações estabelece generalizações sobre estas atividades frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, incluindo limitado número de representantes de cada espécie, sendo costumeira a utilização de apenas um exemplar catalogado como os da coleção ATCC (“American Type Culture Collection”) (Hammer et al., 1999; Smith-Palmer et al., 1998).

É importante considerar que o estudo dos mecanismos de ação de diferentes agentes, no que se refere à ação de promotor de crescimento, também deve considerar a resposta do animal a estes agentes, e bem como aos patógenos. De maneira geral, a resposta dos animais frente à infecção possui complexas etapas que envolvem tanto respostas celulares como humorais. Especialmente em aves, a ausência de linfonodos resulta em que as células de defesa podem ser encontradas nos órgãos linfóides primários e nos secundários, como intestino e fígado (Tizard, 1996). No fígado das aves é comum observar a proliferação de linfócitos em resposta a algumas infecções, formando os chamados agregados linfóides ou centros germinativos. A contagem destes

agregados pode ser usada como método de qualificação e quantificação de imunossupressão (Riddell, 1996). Sousa et al. (2009) observaram que a presença de agregados linfóides no fígado de frangos parece ser influenciada pela severidade da infecção intestinal decorrente da coccidiose aviária. De fato, o estudo da resposta imune dos animais normalmente envolve o desafio dos animais com infecções como coccidiose, salmonela, entre outros patógenos, que são importantes por afetarem desempenho dos animais no campo e/ou terem importância em saúde pública.

Neste contexto, para entender o potencial antimicrobiano e imunomodulador de óleos essenciais e de extratos de plantas, foi desenvolvido o presente estudo. Este trabalho foi dividido em dois experimentos. No primeiro objetivou-se avaliar a eficiência de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e extrato de pimenta vermelha (*Capsicum annuum*), no controle *Clostridium perfringens* após desafio com *Eimeria acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. O segundo experimento foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficiência deste mesmo produto em aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. Paralelamente, foi investigada a resposta do sistema imune das aves às infecções e/ou ao uso de produtos de plantas pela presença de células CD3 positivas (linfócitos T) na mucosa intestinal.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> . Acesso em 20/10/2007.

BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003, p.167-182.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.94, n.3, p.223-252, 2004.

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

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.308-316, 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.

JANSSEN, A. M.; CHIN, N. L. J.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. Statistics and correlations. **Pharmacology Weekly**. Science Ed. n.8, p.289-292, 1986.

JEAUROUND, E.; SCHUMANN, B.; CLUNIES, M. et al. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v.80, p.394, 2002.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.813-829, 2003.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plant extracts. **Feed Mix – The International Journal on Feed, Nutrition and Technology**, v.18, n.6, p.19-24, 2000.

KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MARZ, R.; SCHINDLER, G.; GRAEFE, E.V.; VEIT, M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. **Planta Medica**, v. 66, p.495-505, 2000.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Ed. UFV; 2000.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP, 2001, p.141-157.

MILTENBURG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p.87-100.

PERES, L.E.P. Metabolismo secundário. Disponível em: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/metSec.pdf>. Acesso em 21 de outubro de 2009.

PETER, K.V. **Handbook of herbs and spices**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001.

RIDDEL, C. **Avian histopathology**. 2 ed. Pennsylvania: Library of Congress, 1996, p.22.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998.

SOUSA, T.B.A.; PICKLER, L.; SOUSA, R.S.; BONA, T.D.M.M.; MIGLINO, L.B.; SANTIN, E. Avaliação da concentração de agregados linfóides no fígado em aves desafiadas com *Eimeria* spp. In: 21º CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: APINCO, 2009, CD-ROM.

TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology: An Introduction**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996, 132p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals: Report of a WHO meeting, Berlin, Germany. p.1-39, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. in document WHO/CDS/CSR/APH/2000. WHO, Geneva, Switzerland, p.1-23, 2000.

CAPÍTULO 1

ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NA DIETA FRANGOS DE CORTE PARA O CONTROLE DE EIMERIOSES E CLOSTRIDIOSE

Artigo redigido de acordo com as normas da
Revista Archives of Veterinary Science

ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NA DIETA FRANGOS DE CORTE PARA O CONTROLE DE EIMERIOSES E CLOSTRIDIOSE

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a eficiência da mistura de composto vegetal a base de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e alecrim (*Rosmarinus officinallis*) e extrato de pimenta vermelha (*Capsicum annum*) no controle *Clostridium perfringens* em aves desafiadas com *Eimeria* sp. Aves de um dia de idade foram divididas em três grupos: T1 – dieta controle sem aditivo promotor de crescimento; T2 – dieta com adição de avilamicina (10 ppm); e T3 – dieta com adição de composto vegetal (100 ppm). Não foi adicionado anticoccidiano nas dietas. Aos 15 dias de idade os animais foram inoculados com um *pool* de oocistos de *Eimeria acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. Aos sete e 14 dias pós-inoculação (PI) foram realizadas necropsias de seis aves por tratamento para avaliação de lesões de coccidiose e enterites inespecíficas. Aos 14 dias PI foi coletado conteúdo cecal para contagem de *Clostridium* sp. O uso do composto vegetal na alimentação de frangos reduziu lesões específicas de *E. maxima* e *E. tenella* aos 14 dias PI como também diminuiu a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Clostridium perfringens* no conteúdo do ceco das aves em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: *Clostridium*, *Eimeria*, extrato de ervas, óleos essenciais.

**OREGANO, ROSEMARY, CINNAMON ESSENTIAL OILS AND PEPPER
EXTRACT IN BROILER FEED TO CONTROL EIMERIOSIS AND
CLOSTRIDIOSIS**

ABSTRACT

In this study, the effectiveness of a vegetal compost based on essential oil of oregano (*Origanum vulgare*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and rosemary (*Rosmarinus officinallis*) and extract of red pepper (*Capsicum annuum*) in controlling *Clostridium perfringens* in poultry after challenged with *Eimeria* sp was evaluated. Day-old chicks were allotted into three groups: T1 – control diet without growth promoter; T2 – diet with addition of avilamycin (10 ppm); and T3 – diet with addition of the vegetal compost (100 ppm). Anticoccidial was not added in the diets. At 15 days of age the animals were inoculated with a pool of *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* oocysts. At seven and 14 days post-inoculation (PI) necropsies of six birds per treatment were performed for evaluation of lesions of coccidiosis and nonspecific enteritis. At 14 days PI cecal contents were collected for enumeration of *Clostridium* sp. The use of vegetal compost in broiler diets controlled specific *E. maxima* and *E. tenella* enteritis at 14 days PI and also reduced the counting of colony-forming unit (CFU) of *Clostridium perfringens* in cecum compared to the control group.

Key words: *Clostridium*, *Eimeria*, essential oils, herbs extract.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 50 os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento, controlando micro-organismos prejudiciais ao processo de digestão e de absorção e promovendo melhoras nos índices zootécnicos em animais criados sob condições cada vez mais intensivas (Menten, 2001). Em 1997, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório sugerindo a ligação entre os antibióticos usados na alimentação destes animais e o aumento da resistência antimicrobiana no homem (World Health Organization, 1997). Em 2000, outro relatório recomendava que fosse banido o uso dos antibióticos promotores de crescimento de mesma classe dos usados em seres humanos (World Health Organization, 2000). Sendo assim, a partir de janeiro de 2006, a União Européia proibiu o uso de qualquer tipo de antibiótico e quimioterápico como promotor de crescimento na produção animal, que eram vistos como fatores de risco para a saúde pública pelo seu eventual papel na ocorrência de resistência microbiana.

As principais alternativas que têm sido pesquisadas incluem prebióticos, probióticos, enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais (Miltenburg, 2000; Jearound et al., 2002). A utilização de plantas como medicamentos tem acompanhado a história da civilização e se constitui em fonte de recursos à moderna farmacologia. A inclusão de extratos vegetais às rações animais requer ausência de toxicidade e assim os óleos essenciais de vegetais, tradicionalmente utilizados como condimentos ou temperos, enquandram-se neste fim, agora, com renovado interesse (Brugalli, 2003).

Óleos essenciais constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (Simões e Spitzer, 1999), cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, etc, em diferentes concentrações, nos quais, um composto

farmacologicamente ativo é majoritário. No orégano, este composto é o carvacrol (3 a 17%); e, na canela, o cinamaldeído (75%) (Farmacopea Italiana, 1998).

Como mecanismo de ação dos óleos essenciais acredita-se que a maioria deles exerce efeito antimicrobiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, causando a interrupção dos processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, o que resulta em perda do controle quimiosmótico da célula afetada, levando a morte bacteriana (Dorman e Deans, 2000).

A coccidiose é uma das doenças aviárias causada por protozoários do gênero *Eimeria*, presente em praticamente todos os plantéis avícolas. Causa prejuízos, tanto pelo aumento da conversão alimentar, diminuição na taxa de crescimento e, às vezes, por aumentar a mortalidade nos lotes (Mc Dougald, 1998), quanto por ser também um fator predisponente ao surgimento de clostridiose, por danificar os tecidos intestinais e modificar as funções do trato gastrointestinal quebrando as barreiras naturais de defesa do animal (Gil de los Santos et al., 2008). As principais eimérias que causam problemas em avicultura são a *Eimeria acervulina* que provoca principalmente lesões em duodeno, a *E. maxima* que causa lesões em jejuno e íleo e a *E. tenella* que causa processos hemorrágicos no ceco das aves. Embora o uso de anticoccidianos seja eficiente no controle da doença o aparecimento de resistência limita seu uso na eliminação da doença em granjas comerciais, em vista disso estudam-se alternativas para o controle desta enfermidade, como óleos essenciais e extratos vegetais. Christaki *et al* (2004) obtiveram resultados positivos com relação ao desempenho zootécnico (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar) além de observarem uma redução nas lesões

em ceco dos animais tratados com mistura comercial de óleos essenciais em frangos desafiados com *Eimeria tenella*.

O *Clostridium perfringens* participa da microbiota intestinal normal de frangos, porém, alguns fatores como mudanças bruscas na alimentação, stress, salmoneloses, micotoxinas e coccidiose faz com que este micro-organismo reproduza-se rapidamente produzindo toxinas que causam lesões ulcerativas e necrose da mucosa intestinal levando a uma doença conhecida como enterite necrótica. Estima-se que esta doença possa causar perdas da ordem de até 33% nos plantéis avícolas devido aos gastos com medicamentos, redução no ganho de peso e aumento da conversão alimentar (Lovland e Kaldhusdal, 2001). A capsaicina, o cinamaldeído e o carvacrol podem reduzir o número de *C. perfringens* em ceco de frangos (Jamroz e Kamel, 2002), bem como uma mistura de óleos essenciais a base de carvacrol, timol, cinamaldeído, eugenol e capsaicina reduziu a contagem desta bactéria em duodeno, jejuno, íleo e ceco de frangos.

A resposta do organismo frente à infecção possui complexas etapas que envolvem tanto respostas celulares como humorais. Como as aves não possuem linfonodos, as células de defesa podem ser encontradas nos órgãos linfóides primários e nos secundários, como intestino e fígado (Tizard, 1996). No fígado das aves é comum observar a proliferação de linfócitos em resposta a algumas infecções, formando os chamados agregados linfóides ou centros germinativos. A contagem destes agregados pode ser usada como método de qualificação e quantificação de imunossupressão (Riddel, 1996). Sousa et al. (2009) observaram que a presença de agregados linfóides no fígado de frangos parece ser influenciada pela severidade da infecção intestinal decorrente da coccidiose aviária.

Neste contexto, aumenta a importância da exploração do potencial antimicrobiano, bem como de outras propriedades, das plantas e de seus respectivos constituintes. Este

trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato pimenta vermelha, no controle da coccidiose e do *Clostridium perfringens* em frangos desafiados com *Eimeria acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram alojadas 51 aves de um dia de idade em cama de maravalha, divididas em três grupos sendo 17 animais por tratamento. Cada tratamento recebeu ração formulada de acordo com os níveis recomendados pelo NRC (1994) sem adição de anticoccidiano, sendo que o T1 recebeu dieta controle sem adição de antibiótico promotor de crescimento (APC), T2 dieta com adição de 10 ppm de avilamicina, e T3 dieta com adição de 100 ppm de composto vegetal sendo uma mistura comercial a base de óleos essenciais de orégano (carvacrol), alecrim (cineol), canela (cinamaldeído) e extrato de pimenta vermelha (capsaicina). Os níveis dos produtos adicionados nas rações seguiram as recomendações dos fabricantes. Cada dieta foi fornecida durante todos os dias do experimento.

O composto vegetal possui óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e alecrim (*Rosmarinus officinallis*) e extrato de pimenta vermelha (*Capsicum annuum*) e apresenta garantias mínimas de 4500 mg/kg de carvacrol, 1,0 g/kg de cinamaldeído, 2,0 g/kg de cineol e 20 g/kg de capsaicina. De acordo com o FDA (*Code of Federal Regulations* 21 CFR 172.515, 2008; 21 CFR 582.10, 2001) estas matérias primas são consideradas seguras e inócuas para animais e seres humanos.

Foi realizada necropsia de cinco aves por tratamento aos nove dias de idade para coleta de fragmentos de fígado sendo fixado em solução formalina tamponada a 10%. As amostras foram processadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise

histológica utilizando microscópio óptico (Olympus BH2 Olympus America Inc., NY, USA). Foi realizada a contagem de agregados linfóides por campo, sendo total de 20 campos por tratamento com aumento de 10x.

Aos 15 dias de idade os animais receberam 1,8 mL de inóculo por via oral, com seringa acoplada em sonda, com pool de oocistos esporulados de *Eimeria acervulina* (200×10^3), *E. maxima* (50×10^3) e *E. tenella* (10×10^3). Os oocistos foram obtidos de cepas de campo replicados de acordo com Costa e Paiva (2007).

Aos 22 e 29 dias de idade (7 e 14 dias pós -inoculação), foi realizada a eutanásia e necropsia de 36 aves, sendo 18 aos 22 dias e 18 aos 29 dias de idade (seis aves por tratamento) para avaliação intestinal de lesões de coccidiose e enterites inespecíficas. As lesões de coccidiose foram avaliadas segundo os escores de lesão definidos por Johnson e Reid (1970) (Grau 0 – sem lesão; Grau 1 – lesão leve; Grau 2 – lesão moderada; Grau 3 – lesão severa; Grau 4 – lesão muito severa), e as lesões de enterites inespecíficas foram classificadas em escores de acordo com Saad (2009) (Grau 0 – sem lesão; Grau 1 – lesão leve; Grau 2 – lesão moderada; Grau 3 – lesão severa).

Na segunda coleta, 14 dias pós-inoculação, também foram coletados fragmentos de fígado para contagem de agregados linfóides e conteúdo cecal para contagem de *Clostridium perfringens*.

Para o procedimento de contagem de *Clostridium perfringens* foi adicionado 1,0 g de conteúdo cecal em 9 mL de solução fisiológica estéril, desta diluição retirou-se 1 mL sendo pipetado em um tubo com 9,0 mL de solução fisiológica estéril e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} . Retirou-se 100 μ L de cada diluição e foi espalhado em placas de *Reinforced Clostridium Agar* (Himedia[®]) enriquecido com sangue de carneiro em duplicata. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose (Oxoid[®]) e levadas a estufa regulada a 35°C por 24 horas. Foi verificado o crescimento de colônias

típicas de *Clostridium perfringens* que apresentavam um halo de beta-hemólise sendo confirmadas pelo método de Gram. Posteriormente, as colônias foram contadas e os resultados foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº6 publicada em 26 de agosto de 2003 (MAPA).

A contagem das colônias de *Clostridium* foi transformada em Log10 para converter os dados em distribuição normal para realização da análise estatística. A contagem de agregados linfóides, colônias de *Clostridium* e escores de lesão foram analisados no programa StatView for Windows Copyright[©] 1998 (SAS Institute Inc., NC, USA) com ANOVA e teste de *Post Hoc* de Fischer com significância menor que 0,05.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentados os dados referentes a mediana dos escores de lesão específica de coccidiose aos 22 dias de idade (sete dias após a inoculação), não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 1 – Mediana de escores de lesões específicas de coccidioses no trato gastrintestinal observadas na necropsia de 18 frangos aos 22 dias de idade (sete dias após a inoculação de eimerias) ($P>0,05$).

<i>Eimeira</i> sp.	Controle	Avilamicina	Composto vegetal*
<i>E. acervulina</i>	0,6	0,4	1,4
<i>E. maxima</i>	0,4	0,4	1,4
<i>E. tenella</i>	2,0	2,2	1,2

* Composto vegetal - óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha.

Não foram observadas diferenças significativas nas avaliações de enterites inespecíficas, tanto aos 22 quanto aos 29 dias de idade (7 e 14 dias pós-inoculação de eimérias). Na tabela 2 estão apresentados os dados referentes a mediana dos escores de lesão específica de coccidiose aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação). Não foi observada diferença significativa ($P=0,184$) para lesões de *E. acervulina* entre os

tratamentos. Entretanto, para lesões de *E. maxima* e *E. tenella*, as aves dos tratamentos com avilamicina e composto vegetal apresentaram significativa redução em severidade ($P=0,033$).

Tabela 2 – Mediana de escores de lesões específicas de coccidiose no trato gastrintestinal observadas na necropsia de 18 frangos aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação de eimerias).

<i>Eimeira</i> sp.	Controle	Avilamicina	Composto vegetal*	<i>P</i>
<i>E. acervulina</i>	1,0	0,5	0,2	0,184
<i>E. máxima</i>	0,8 ^{a**}	0,0 ^b	0,0 ^b	0,033
<i>E. tenella</i>	0,8 ^a	0,3 ^b	0,0 ^b	0,006

* Composto vegetal - óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha.

**Valores seguidos por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$).

Na contagem de agregados linfóides (AL) no fígado das aves com nove dias de idade, antes de serem inoculados com eimérias, não foi observado diferença estatística ($P=0,609$), havendo poucos agregados presentes (grupo controle e avilamicina – média de 0,05 AL; grupo composto vegetal – zero). Aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação com eimérias) também não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao número de agregados linfóides no fígado ($P=0,687$).

Na tabela 3 estão apresentados os dados referentes à contagem de colônias de *Clostridium perfringens* aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação de eimerias), mostrando que o grupo de aves alimentadas com dieta com avilamicina controlou significativamente a contagem de *Clostridium perfringens*, enquanto que o grupo tratado com o composto vegetal apresentou redução significativa deste microrganismo em relação ao grupo controle.

Tabela 3 – Média dos resultados de contagem de colônias de *Clostridium perfringens* (Log10 UFC/g) de conteúdo cecal de 6 frangos por tratamento aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação de eimérias) ($P < 0,0001$).

Tratamento	Log10 UFC/g
Controle	10×10^8 ^{a**}
Avilamicina	0 ^b
Composto vegetal*	$2,7 \times 10^8$ ^c

* Composto vegetal - óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha.

**Valores seguidos por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

O uso de avilamicina e o composto vegetal a base de óleos essenciais de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta na dieta reduziram significativamente os escores de lesões intestinais causados por *E. maxima* e *E. tenella* aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação). Vários estudos têm demonstrado que compostos a base de óleos essenciais possuem atividade coccidiostática (Allen et al., 1997; Christaki et al., 2004; Giannenas et al., 2003; Youn e Noh, 2001) ou reduzem o impacto econômico causado pelos coccídios (Duffy et al., 2004; Duffy et al., 2005; Ibrir et al., 2002).

O número e a composição dos microorganismos variam consideravelmente ao longo do trato gastrointestinal. O ceco das aves é reconhecido como o segmento de maior colonização de microorganismos, apresentando quantidades que variam entre 10^{10} a 10^{12} UFC/g. É neste local que ocorre a fermentação microbiana, sendo que grande número de bactérias Gram-positivas e negativas estão presentes neste local como Bifidobactérias, Bacteróides, *Streptococcus* e *Clostridium*. (Gabriel et al, 2006). Observa-se que a utilização de avilamicina e do composto vegetal reduziram o número de colônias de *Clostridium perfringens* no ceco das aves, quando comparado ao grupo controle. Estes resultados corroboram com os relatados por Mitsch et al. (2004), onde o uso de óleos essenciais na dieta reduziu a proliferação de *Clostridium perfringens* no

intestino e fezes de frangos de corte, reduzindo o risco de enterite necrótica, assim como Jamroz e Kamel (2002) também observaram redução significativa no número de *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* em ceco de frangos de corte alimentados com mistura de óleos essenciais de capsaicina, cinamaldeído e carvacrol.

A alteração da permeabilidade da membrana das paredes celulares das bactérias se deve ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas. As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos, formando uma superfície hidrofílica. Este caráter hidrofílico cria uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas como óleos essenciais, explicando a resistência de bactérias Gram-negativas a esses aditivos (Dorman e Deans, 2000). Sendo o *Clostridium perfringens* uma bactéria Gram-positiva, é possível utilizar compostos a base de óleos essenciais como alternativas para o controle da enterite necrótica em frangos de corte.

Pode-se especular que o controle das lesões causadas por *E. tenella* tenha interferido na redução da colonização por *C. perfringens* por melhorar a absorção de nutrientes. O aumento na digestibilidade e absorção de nutrientes reduzem a disponibilidade de substrato para o desenvolvimento de bactérias patógenas, como por exemplo, o *Clostridium perfringens* (Gil de los Santos et al., 2008; Oetting et al., 2006). Alguns estudos relatam que a inclusão de composto vegetal (orégano, canela e pimenta) na alimentação de frangos de corte melhora o coeficiente de digestibilidade da matéria seca, melhorando o ganho de peso e a conversão alimentar (Hernández et al., 2004; Jamroz e Kamel, 2002). De acordo com Jamroz e Kamel (2002), o aumento da digestibilidade dos nutrientes devido à suplementação com óleos essenciais favoreceu o equilíbrio da microbiota, diminuindo o potencial de adesão de patógenos ao epitélio intestinal.

Entretanto, alguns autores relatam que uma possível ausência de efeito no desempenho dos animais poderia estar relacionada à composição da dieta basal utilizada e/ou às condições ambientais a que os animais são submetidos (Lee et al., 2003), como por exemplo superlotação (Zhang et al., 2005). Dietas altamente digestíveis limitam o desenvolvimento de bactérias no trato intestinal, pela redução de substrato disponível ao crescimento bacteriano, diminuindo o potencial antimicrobiano dos compostos vegetais. O mesmo pode acontecer se os animais forem alojados em instalações com baixo desafio sanitário e com boas condições de higiene e manejo (Lee et al., 2003). Ainda, Barreto et al. (2008) não observaram diferença significativa no desempenho de frangos de corte frente ao uso de óleos essenciais separadamente (orégano, cravo, canela e pimenta vermelha), porém isto pode ter ocorrido devido ao fato dos extratos terem sido fornecidos isoladamente ou pela dieta e ambiente serem de boa qualidade, não possibilitando à esses compostos expressarem sua atividade. Christaki *et al* (2004) estudaram o efeito de uma mistura comercial de óleos essenciais em frangos desafiados com *Eimeria tenella*, e obtiveram resultados positivos com relação ao desempenho (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar) e observaram redução nas lesões em ceco nos animais tratados com a mistura.

Na contagem de agregados linfóides no fígado 14 dias após inoculação com eimérias não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas foi possível constatar redução numérica de agregados linfóides no grupo tratado com o composto vegetal em relação ao grupo controle. Esta forma de avaliação da reposta inflamatória frente ao desafio com *Eimeria* sp. não é discutida na literatura, sendo apenas relatado por Sousa et al. (2009), que observaram que a presença de agregados linfóides no fígado parece ser influenciada pela severidade da infecção intestinal decorrente da coccidiose aviária. Maiores estudos devem ser realizados nesta área para compreender estes resultados.

Observa-se que o uso do composto vegetal utilizado neste trabalho pode ser eficiente em controlar lesões causadas por protozoários do gênero *Eimeria* em aves e também controlar a população de *Clostridium perfringens* no ceco dos animais, porém a avilamicina utilizada como antibiótico promotor de crescimento mostra-se mais eficiente e devido ao diferente mecanismo de ação e apresenta uma ação mais imediata, enquanto que os compostos vegetais necessitam de maior tempo para exibir o seu potencial no controle da microbiota intestinal.

CONCLUSÃO

O uso de avilamicina inibiu a colonização por *Clostridium perfringens* no ceco das aves, enquanto que o produto a base de óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha na dose de 100 ppm controlou parcialmente a colonização por *C. perfringens* no ceco, sendo este resultado significativamente melhor que no grupo controle. O composto vegetal e a avilamicina foram capazes de reduzir significativamente as enterites específicas causadas por *Eimeria maxima* e *E. tenella* nas aves aos 29 dias de idade (14 dias após a inoculação) e podem ser utilizados no controle destas enfermidades.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, P.C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. **Poultry Science**, v.76, p.1156-1163, 1997.
- BARRETO, M.S.R.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M.C.; PEREIRA, P.W.Z.; RIZZO, P.V. Plant extracts used as growth promoters in broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.10, n.2, p.109-115, 2008.
- BRASIL. 2003. MAPA, Instrução Normativa nº6 publicada em 26 de agosto de 2003.
- BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003, p.167-182.

- CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P.; GIANNENAS, I.; PAPAZHARIADOU, M.; BOTSOGLOU, N.; SPAIS, A.B. Effect of a mixture of herbal extracts on broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. **Animal Research**, v.53, p.137-144, 2004.
- COSTA, C.A.F.; PAIVA, D.P. **Cultivo in vivo e in vitro e diagnóstico específico de Eimeria spp.** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007, 102p.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.308-316, 2000.
- DUFFY, C.F.; SIMS, M.D.; POWER, R.F. Preliminary evaluation of dietary Natustat™ versus Histostat® (Nitarosone) for control of *Histomonas meleagridis* in broiler chickens on infected litter. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.12, p.753-757, 2004.
- DUFFY, C.F.; MATHIS, G.F.; POWER, R.F. Effects of Natustat™ supplementation on performance, feed efficiency and intestinal lesion scores in broiler chickens challenged with *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.185-190, 2005.
- FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Istituto Poligrafico e Zecco dello Stato, v.1, p.206-210, 1998.
- GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S.; GUILLOT, J.F. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World's Poultry Science Journal**, n.62, p.499-511, 2006.
- GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N.; SPAIS, A.B. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives of Animal Nutrition**, v.57, n.2, p.99-106, 2003.
- GIL DE LOS SANTOS, J.R.; CONCEIÇÃO, F.R.; GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2076-2082, 2008.
- HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V.; ORENCO, J.; MEGIAS, M. D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, v.83, p.169-174, 2004.
- IBRIR, F.; GREATHEAD, H.M.R.; FORBES, J.M. The effect of thymol/carvacrol treatments on the performance of broiler chickens infected with *Eimeria acervulina*. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.61, n.OCB, 2002.
- JAMROZ, D.; KAMEL, C. Plant extracts enhance broiler performance. **Journal of Animal Science**, v.80, p.41, 2002.
- JEAUROUND, E.; SCHUMANN, B.; CLUNIES, M. et al. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v.80, p.394, 2002.
- JOHNSON, J.; REID, W.M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, v.28, p.30-36, 1970.
- LEE, K.W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H.J. et al. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**, v.44, n.3, p.450-457, 2003.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v.30, p.73-81, 2001.

Mc DOUGALD, L.R. Intestinal protozoa important to poultry. **Poultry Science**, v.77, p.1156-1158, 1998.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP, 2001, p.141-157.

MILTENBURG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p.87-100.

MITSCH, P.; ZITTERL-EGLESEER, K.; KÖHLER, B.; GABLER, C.; LOSA, R.; ZIMPERNIK, I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry Science**, v.83, p.669-675, 2004.

NATIONAL RESEARCH CONCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9th rev.ed. National Academy Press: Washington, D.C. 1994.

OETTING, L.L.; UTIYAMA, C.E.; GIANI, P.A.; RUIZ, U.S.; MIYADA, V.S. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1389-1397, 2006.

RIDDEL, C. **Avian histopathology**. 2 ed. Pennsylvania: Library of Congress, 1996, p.22.

SAAD, M.B. **Efeito da suplementação de selênio orgânico na resposta imunológica de frangos de corte**. 2009. Curitiba, 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.18, p.387-416.

SOUSA, T.B.A.; PICKLER, L.; SOUSA, R.S.; BONA, T.D.M.M.; MIGLINO, L.B.; SANTIN, E. Avaliação da concentração de agregados linfóides no fígado em aves desafiadas com *Eimeria* spp. In: 21° CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: APINCO, 2009. CD-ROM.

TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology: An Introduction**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996, 132p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals: Report of a WHO meeting, Berlin, Germany. p.1-39, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. in document WHO/CDS/CSR/APH/2000. WHO, Geneva, Switzerland, p.1-23, 2000.

YOUN, H.J.; NOH, J.W. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.4, p.257-263, 2001.

ZHANG, K.Y.; YAN, F.; KEEN, C.A.; WALDROUP, P.W. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.9, p.612-619, 2005.

CAPÍTULO 2

ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ALECRIM, CANELA E EXTRATO DE PIMENTA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE PARA O CONTROLE DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS

Artigo redigido de acordo com as normas da
Revista Archives of Veterinary Science

**ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ALECRIM, CANELA E
EXTRATO DE PIMENTA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE
PARA O CONTROLE DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS**

RESUMO

No presente estudo, objetivou-se avaliar a eficiência de um composto vegetal a base de óleo essencial e extrato de ervas em aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. 24 aves de um dia de idade foram distribuídas em três tratamentos, sendo alimentadas com ração sem adição de coccidiostático. T1 – dieta controle sem adição de antibiótico promotor de crescimento, T2 – dieta com 10 ppm de Avilamicina, T3 – dieta com 100 ppm de um composto vegetal a base de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e de alecrim (*Rosmarinus officinallis*) e extrato de pimenta vermelha (*Capsicum annum*). Aos 21 dias de idade todas as aves foram inoculadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis. Foram realizados suabes de cloaca de todos os animais às 24, 48 e 72 horas pós-inoculação (PI) e as amostras foram processadas para contagem de *Salmonella*. No terceiro dia após a inoculação, as oito aves de cada tratamento foram necropsiadas. Coletou-se fragmentos de duodeno, íleo e ceco, para avaliação histológica, morfométrica, imuno-histoquímica (duodeno e ceco) e eletromicrografia de varredura (íleo e ceco). Os resultados foram submetidos à ANOVA ($P < 0,05$). A utilização do composto vegetal e da avilamicina diminuiu a excreção de *Salmonella* em aves 72 horas PI de *Salmonella*. A utilização do composto vegetal aumentou a relação vilo/células CD3⁺ no duodeno, em relação ao grupo avilamicina e controle, porém não teve efeito sobre a expressão destas células no ceco.

Palavras-Chave: eletromicrografia de varredura, imuno-histoquímica, promotor de crescimento, *Salmonella* Enteritidis.

**OREGANO, ROSEMARY, CINNAMON ESSENTIAL OILS AND PEPPER
EXTRACT IN BROILER FEED TO CONTROL *SALMONELLA* ENTERITIDIS**

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the efficiency of a product based on essential oils and herbal extract in birds challenged with *Salmonella* Enteritidis (SE). 24 day old chicks were allotted to three treatments. T1 – control diet without antibiotics growth promoter, T2 – diet with 10 ppm of Avilamycin, T3 – diet with 100 ppm of a plant compost based on the essential oil of oregano (*Origanum vulgare*), rosemary (*Rosmarinus officinallis*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and red pepper extract (*Capsicum annum*). At 21 days of age all birds were inoculated with 10^5 CFU of SE. Cloacal swabs were collected of all animals at 24, 48 and 72 hours post inoculation and the samples were processed for counting of *Salmonella*. On the third day after inoculation, the eight birds from each treatment were necropsied. Fragments were collected from duodenum, ileum and caecum for histological, morphometric, immunohistochemical (duodenum and caecum) and scanning electron micrograph (ileum and caecum). The results were submitted to ANOVA ($P < 0.05$). The use of plant compost and avilamycin decreased the excretion of *Salmonella* in poultry 72 hours after the inoculation. The use of plant compost increased villous / CD3⁺ cells in the duodenum, compared to group avilamycin and control, but had no effect on the expression of these cells in the cecum.

Key-words: growth promoter, immunohistochemistry, *Salmonella* Enteritidis, scanning electron micrograph.

INTRODUÇÃO

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

O uso dos chamados promotores de crescimento, agentes antibacterianos incorporados na ração animal para melhorar o desempenho animal, não é aplicado com o intuito de reduzir contaminação por *Salmonella*, bem como seu impacto em saúde pública. Entretanto, sabe-se que o uso de antibióticos como profiláticos ou como promotores de crescimento em ração animal reduz o isolamento de *Campilobacter jejuni* e outros patógenos (incluindo *Salmonella*) na carne de aves (Cox Jr., 2005). Assim, se demonstra que a criação orgânica de aves, sem a presença de promotores de crescimento, aumenta o isolamento de *Salmonella* em carcaças de aves (Miranda et al., 2008).

Alternativas a estes promotores de crescimento, poderiam também de alguma forma atuarem na redução da excreção de SE em aves. Dentre as alternativas para os promotores de crescimento descritas na literatura, destaca-se o uso de óleos essenciais e extratos de plantas (Jeauround et al., 2002; Miltenburg, 2000). Os óleos essenciais constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (Simões e Spitzer, 1999), cujos componentes incluem diversas moléculas químicas, nos

quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário. Assim, no orégano, encontra-se o carvacrol (3 a 17%); no tomilho, o timol (40%) e, na canela, o cinamaldeído (75%) (Farmacopea Italiana, 1998).

Os óleos essenciais extraídos de orégano, tomilho, canela, entre outros, têm potencial antimicrobiano significativo (Burt, 2004; Jearound et al., 2002; Kalemba e Kunicka, 2003). Com esta perspectiva, é fundamental avaliar a atividade de óleos essenciais e extratos de planta sobre *Salmonella*, um importante patógeno do intestino de aves, que potencialmente pode contaminar subprodutos como carne e ovos, constituindo-se em grande problema para saúde pública. Desta maneira, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficiência antimicrobiana de um produto a base de óleo essencial e extrato de ervas em aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, além de verificar a presença de células CD3⁺ (linfócitos T) na mucosa intestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram alojadas 24 aves de um dia de idade, distribuídas em um desenho experimental inteiramente casualizado com três tratamentos e oito repetições, sendo cada ave uma repetição. Cada tratamento recebeu ração formulada de acordo com os níveis recomendados pelo NRC (1994) sem adição de coccidiostático, sendo que o T1 recebeu dieta controle sem adição de antibiótico promotor de crescimento, T2 dieta contendo 10 ppm de Avilamicina, T3 dieta contendo 100 ppm de composto vegetal sendo uma mistura comercial a base de óleos essenciais de orégano (carvacrol), alecrim (cineol), canela (cinamaldeído) e extrato de pimenta vermelha (capsaicina). Os níveis dos produtos adicionados nas rações seguiram as recomendações dos fabricantes. Cada dieta foi fornecida durante todos os dias do experimento.

O composto vegetal possui óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e de alecrim (*Rosmarinus officinallis*) e extrato de pimenta vermelha (*Capsicum annuum*) e apresenta garantias mínimas de 4500 mg/kg de carvacrol, 1,0 g/kg de cinamaldeído, 2,0 g/kg de cineol e 20 g/kg de capsaicina. De acordo com o FDA (*Code of Federal Regulations* 21 CFR 172.515, 2008; 21 CFR 582.10, 2001) estas matérias primas são consideradas seguras e inócuas para animais e seres humanos.

As aves foram identificadas por anilhamento na membrana da asa e alojadas de 01 a 24 dias de vida em boxes experimentais. Todas as aves receberam ração e água à vontade em todo o período experimental, com controle de temperatura, mantendo-se o conforto das aves nesse ambiente.

Inoculação de *Salmonella*

Cultura contendo *Salmonella* sorotipo Enteritidis (SE) isolada de frangos de corte e mantida sob refrigeração foi cultivada por 12 horas à 37° C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e posteriormente plaqueada em meio Ágar de Xilose Lisina Deoxicolato (XLD) e incubado por 24 horas. Apenas uma colônia foi transferida para caldo BHI e incubada por 37° C por duas horas.

Aos 21 dias de idade todas as aves receberam 1,0 mL de inóculo via oral contendo 10⁵ UFC de SE, com o uso de seringa acoplada em sonda diretamente no esôfago das aves.

Análise Microbiológica

Suabes de cloaca de todos os animais foram coletados às 24, 48 e 72 horas pós-inoculação e as amostras foram processadas para contagem de *Salmonella*.

Os suabes foram colocados em tubos contendo 2,0 mL de água peptonada 2%. Foi retirado 1,0 mL desta solução e pipetado em tubo contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) e assim sucessivamente até as diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Foi retirado 100 μ L de cada diluição e plaqueado em duplicata em meio XLD. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h para posterior contagem das colônias (adaptado de Desmidt et al., 1998). Os resultados foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº6 publicada em 26 de agosto de 2003 (Brasil - MAPA).

Os tubos contendo os suabes e a água peptonada 2% foram incubados a 35°C por 24h. Quando não havia a presença de colônias típicas de *Salmonella* nas placas após 24h de incubação, era retirado 100 μ L da solução de suabe em água peptonada 2% e acrescido em tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, sendo então incubado em estufa regulada a 42°C por 24h para confirmação da presença ou ausência de *Salmonella*.

Necropsia

Aos 24 dias de vida das aves, ou seja, no terceiro dia após a inoculação, as oito aves de cada tratamento foram eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas. Foram coletados fragmentos de duodeno, íleo e ceco, em solução formalina tamponada a 10%, para avaliação histológica, morfométrica, imuno-histoquímica (duodeno e ceco) e eletromicrografia de varredura (íleo e ceco).

Análises histológicas

As amostras de duodeno, íleo e ceco foram processadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Alcian Blue para análise histológica. As variáveis estudadas nos intestinos foram altura dos vilos, profundidade das criptas, contagem de células caliciformes (coradas em azul), com leitura em aumento de 40x de 20 vilos e criptas em cada grupo experimental (adaptado de Maiorka et al., 2000). As análises morfométricas do epitélio intestinal foram feitas em microscopia de luz, em sistema analisador de imagens (Motic Images Plus 2.0-Motic China Group Co.,2006) acoplado ao microscópio (Olympus BH2 Olympus America Inc., NY, USA). Após a obtenção dos dados, foi realizada a relação vilo/células caliciformes e vilo/cripta.

Fragmentos de duodeno e ceco também foram coletados para realização de imuno-histoquímica; e fragmentos de íleo e ceco foram coletados para eletromicrografia de varredura.

Imuno-histoquímica

As seções de duodeno e ceco foram submetidas à imuno-histoquímica. A recuperação antigênica foi realizada colocando-se as amostras em solução Tampão Citrato pH 6,0 em microondas por 10 minutos. Na sequência, as amostras receberam anticorpo policlonal desenvolvido em coelhos como anticorpo primário anti-CD3 (DAKO Corporation, CA, USA), diluído 1:750, por 40 minutos em temperatura ambiente. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação (Kit ADVANCE[®] - DAKO Corporation, CA, USA) por 40 minutos em temperatura ambiente. Para revelação utilizou-se cromógeno (Kit DAB[®] - DAKO Corporation, CA, USA) por 5 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina Meyer por um

minuto. As análises imuno-histoquímicas dos intestinos foram feitas em microscopia de luz, em sistema analisador de imagens (Motic Images Plus 2.0-Motic China Group Co.2006), acoplado ao microscópio (Olympus BH2 Olympus America Inc., NY, USA). Nas amostras de duodeno e ceco foi realizada a quantificação de células CD3 positivas intra-epiteliais, em toda a extensão do vilos, sendo contado 10 vilos por tratamento. Foi realizada também a relação vilos/células CD3⁺.

Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico StatView for Windows Copyright[©] 1998 (SAS Institute Inc., NC, USA). A contagem de colônias foi transformada em Log 10 para diminuir a amplitude dos resultados. Os resultados da altura dos vilos, profundidade das criptas, relação vilos-cripta e contagem das células caliciformes foram submetidos à ANOVA ($P < 0.05$) e caso as médias obtidas apresentassem diferença significativa, essas eram submetidas ao teste de Tukey.

RESULTADOS

Na contagem de colônias de *Salmonella* após coleta de suabe de cloaca de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis (SE), foi observada significativa diferença 24 e 72 horas após a inoculação (Tabela 1). Nas primeiras 24 horas, o grupo que recebeu avilamicina na dieta apresentou contagem significativamente menor em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu o composto vegetal. Entretanto, 72 horas após a inoculação, tanto o grupo que recebeu avilamicina na dieta quanto o que recebeu o composto vegetal obtiveram contagem significativamente inferior ao grupo controle.

Tabela 1 – Contagem de colônias de *Salmonella* observadas em suabe de cloaca de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis 24, 48 e 72 horas após a inoculação (PI) (Média \pm Desvio Padrão dos valores expressos em Log 10).

Horas PI	Controle	Avilamicina	Composto vegetal*	P
24 horas	3,68 \pm 0,90 ^{a**}	0,77 \pm 1,55 ^b	2,48 \pm 1,70 ^a	0,051
48 horas	0,91 \pm 1,34	0,00 \pm 0,00	1,50 \pm 1,73	0,298
72 horas	4,15 \pm 0,89 ^a	1,70 \pm 1,96 ^b	1,19 \pm 1,49 ^b	0,047

* Composto vegetal - óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha.

**Valores seguidos por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

Na avaliação histológica de duodeno (tabela 2), foi observado altura de vilos significativamente maior no grupo alimentado com composto vegetal em relação ao controle, sendo similar ao grupo avilamicina. O número de células caliciformes também foi significativamente maior, inclusive em relação ao grupo avilamicina, sendo confirmado pela menor relação vilos/células caliciformes. Não houve diferença significativa de profundidade de criptas entre os tratamentos. Entretanto, ao realizar a relação vilos/cripta, observou-se maior relação no grupo composto vegetal. Em relação à imuno-histoquímica, foi observado significativa maior contagem de células CD3⁺ no

grupo que recebeu dieta com avilamicina em relação ao grupo composto vegetal. Porém ao ser realizada a relação vilosidade/células CD3⁺, observou-se incremento significativo para a proporção no grupo composto vegetal em relação ao grupo controle e avilamicina, ou seja, foi observado uma célula CD3⁺ a cada 3,78 µm de altura de vilosidade.

Tabela 2 – Avaliações em microscopia ótica de fragmentos de duodeno de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10⁵ UFC *Salmonella* Enteritidis (Média ± Desvio Padrão).

Variáveis	Controle	Avilamicina	Composto vegetal*	P
Vilosidade (µm)	580,25±145,18 ^{a**}	648,91±141,95 ^{ab}	710,50±115,90 ^b	0,0134
Caliciformes (nº)	142,75±34,55 ^a	146,90±29,84 ^a	200,05±49,54 ^b	<0,0001
Vilo/Caliciforme	4,16 ± 0,91 ^a	4,54 ± 1,18 ^a	3,79 ± 1,19 ^b	0,0376
Cripta (µm)	70,34 ± 21,02	70,58 ± 16,39	60,63 ± 19,71	NS
Vilo/Cripta	9,10 ± 3,48 ^a	9,59 ± 2,74 ^a	12,79 ± 4,11 ^b	0,0038
Células CD3 ⁺ (nº)	279,9 ± 116,57 ^{ab}	329,2 ± 110,65 ^a	196,1 ± 69,13 ^b	0,0216
Vilo/CD3 ⁺	2,32 ± 0,84 ^a	2,38 ± 1,15 ^a	3,78 ± 1,24 ^b	0,0086

* Composto vegetal - óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha.

**Valores seguidos por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

Na avaliação histológica de íleo (tabela 3), também foi observado altura de vilosidade significativamente maior no grupo composto vegetal em relação ao controle e avilamicina. Não houve diferença significativa em relação ao número de células caliciformes. Entretanto, observou-se significativa maior relação vilosidade/células caliciformes no grupo composto vegetal, em que a cada 2,35 µm de altura de vilosidade foi observado uma célula caliciforme. Em relação à profundidade de cripta, foi observado significativa menor profundidade no grupo controle em relação ao grupo composto vegetal. Entretanto, ao realizar a relação vilosidade/cripta, não foi observado diferença significativa.

Tabela 3 – Avaliações em microscopia ótica de fragmentos de íleo de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC *Salmonella* Enteritidis (Média \pm Desvio Padrão).

Variáveis	Controle	Avilamicina	Composto vegetal*	P
Vilosidade (μm)	278,19 \pm 45,22 ^{a**}	249,10 \pm 53,52 ^a	335,04 \pm 39,95 ^b	<0,0001
Caliciformes (n ^o)	168,00 \pm 38,11	173,00 \pm 47,43	168,15 \pm 62,06	NS
Vilo/Caliciforme	1,742 \pm 0,517 ^a	1,558 \pm 0,544 ^a	2,352 \pm 1,093 ^b	0,0047
Cripta (μm)	50,89 \pm 11,84 ^a	57,13 \pm 15,29 ^{ab}	66,71 \pm 21,01 ^b	0,0132
Vilo/Cripta	5,63 \pm 1,19	4,71 \pm 1,80	5,53 \pm 1,82	NS

* Composto vegetal - óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha.

**Valores seguidos por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

Na avaliação histológica dos cecos (tabela 4), foi observado altura de vilo significativamente maior no grupo controle em relação aos grupos avilamicina e composto vegetal. Assim como no íleo, o número de células caliciformes também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, observou-se aumento significativo na relação vilo/células caliciformes no grupo controle em relação aos grupos avilamicina e composto vegetal. Na profundidade de cripta, o grupo controle obteve maior profundidade, seguido pelo grupo composto vegetal, sendo a menor no grupo avilamicina. Na relação vilo/cripta, o grupo avilamicina apresentou proporção significativamente maior quando comparado ao grupo controle. Em relação à imunohistoquímica, foi observado significativa maior contagem de células CD3⁺ no grupo controle em relação ao avilamicina, sendo que o grupo composto vegetal obteve contagem intermediária. Porém, ao ser realizada a relação vilo/células CD3⁺, não foi observada diferença significativa.

Tabela 4 – Avaliações em microscopia ótica de fragmentos de ceco de aves de 21 dias de idade inoculadas com 10^5 UFC *Salmonella* Enteritidis (Média \pm Desvio Padrão).

Variáveis	Controle	Avilamicina	Composto vegetal*	P
Vilosidade (μm)	176,66 \pm 35,10 ^{a**}	85,15 \pm 16,0 ^b	98,17 \pm 17,35 ^b	<0,0001
Caliciformes (n°)	13,65 \pm 8,57	18,0 \pm 11,29	18,0 \pm 7,36	NS
Vilo/Caliciforme	17,94 \pm 10,39 ^a	6,09 \pm 3,55 ^b	6,74 \pm 4,09 ^b	<0,0001
Cripta (μm)	84,98 \pm 22,39 ^a	32,27 \pm 9,38 ^b	45 \pm 11,98 ^c	<0,0001
Vilo/Cripta	2,21 \pm 0,7 ^a	2,86 \pm 1,05 ^b	2,34 \pm 0,79 ^{ab}	0,0489
Células CD3 ⁺ (n°)	63,6 \pm 38,23 ^a	27,7 \pm 19,91 ^b	43,5 \pm 10,82 ^{ab}	0,0151
Vilo/CD3 ⁺	3,50 \pm 1,75	3,20 \pm 1,53	2,53 \pm 0,80	NS

* Composto vegetal - óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha.

**Valores seguidos por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

A figura 1 representa a similaridade na relação vilo/células CD3⁺ no ceco com a contagem de colônias de *Salmonella* 72h após a inoculação de 10^5 UFC de SE demonstrando não haver relação entre as mesmas.

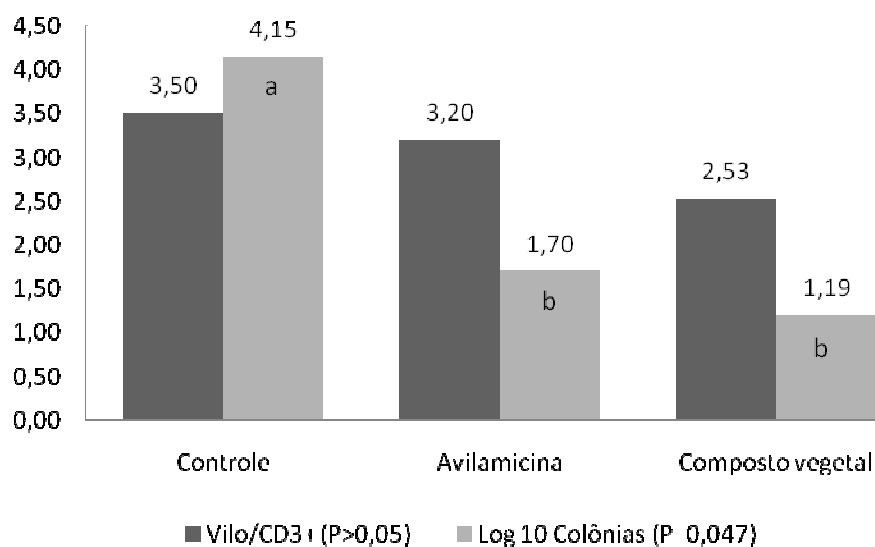


Figura 1 – Representação do Log10 de colônias de *Salmonella* 72h após a inoculação de 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis em aves de 21 dias de idade em comparação à relação vilo/células CD3⁺.

A figura 2 representa quatro imagens de eletromicrografia de varredura da superfície da mucosa do íleo de frangos de corte com 24 dias de idade desafiados com 10^5 UFC de SE submetidos a diferentes tratamentos na alimentação, sendo a figura A o grupo controle, apresentando superfície com espesso muco e com presença de fímbrias de bactérias aderidas ao epitélio; a figura B mostra uma aproximação da superfície mucosa (X350) de ave do grupo controle apresentado fímbrias aderidas; a figura C é referente ao grupo alimentado com dieta com avilamicina apresentando pouco muco e sem fímbrias aderidas; e a figura D refere-se ao grupo alimentado com dieta com composto vegetal, apresentando muco moderado e algumas fímbrias aderidas ao epitélio.

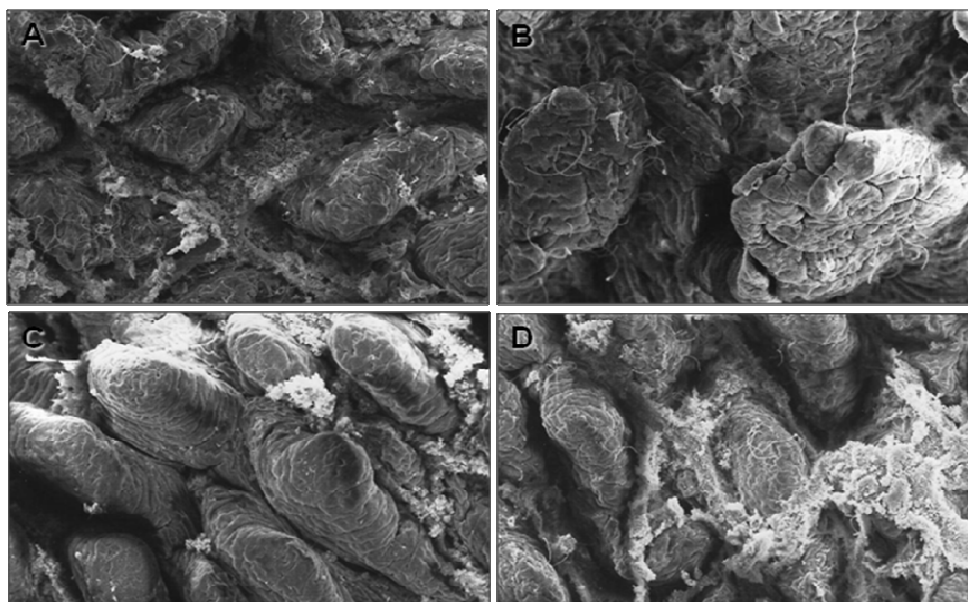


Figura 2 – Eletromicrografia de varredura da superfície da mucosa do íleo de aves com 24 dias de idade desafiadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis submetidas a diferentes tratamentos na alimentação: A) grupo controle, superfície com espesso muco e fímbrias de bactérias aderidas ao epitélio; B) aproximação da superfície mucosa (X350) de ave do grupo controle apresentado fímbrias aderidas; C) grupo alimentado com dieta com Avilamicina apresentando pouco muco e sem fímbrias aderidas; D) grupo alimentado com composto vegetal a base de óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta, apresentando muco moderado e algumas fímbrias aderidas ao epitélio (figuras A, C, D: X 200; B: X 350).

A figura 3 representa também imagens de eletromicrografia de varredura da superfície da mucosa do ceco de aves desafiadas com 10^5 UFC de SE submetidas a diferentes tratamentos na alimentação, sendo a figura A o grupo controle apresentando superfície com espessa camada de muco; a figura B representa uma aproximação da figura A (X 3.500), mostrando estrutura de bastonetes aderidos à mucosa; a figura C representa o grupo alimentado com dieta com avilamicina apresentando pouco muco; e a figura D refere-se ao grupo alimentado com dieta com composto vegetal, apresentando superfície com mucosa limpa.

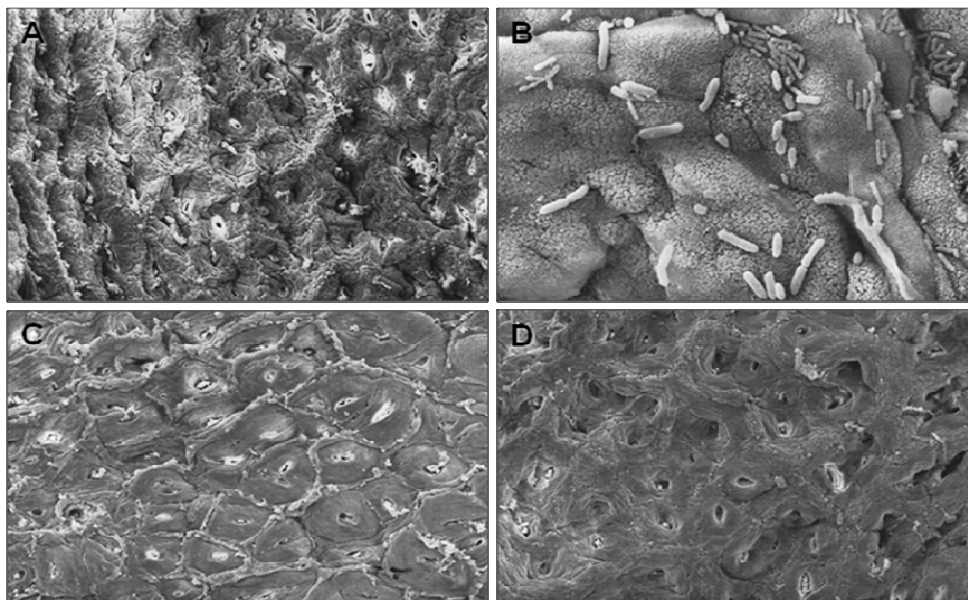


Figura 3 – Eletromicrografia de varredura da superfície da mucosa do ceco de aves com 24 dias de idade desafiadas com 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis submetidas a diferentes tratamentos na alimentação: A) grupo controle, superfície apresentando espessa camada de muco; B) (X 3.500) grupo controle, aproximação mostrando estrutura de bastonetes aderidos à mucosa; C) grupo alimentado com dieta com Avilamicina apresentando pouco muco; D) grupo alimentado com dieta com composto vegetal a base de óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta, superfície mostrando mucosa limpa. (figuras A, C, D: X 200; B: X 3.500).

DISCUSSÃO

No presente estudo, a contagem de colônias de *Salmonella* em suabe de cloaca de aves inoculadas com 10^5 UFC de SE, nas primeiras 24 horas, demonstrou que o grupo que recebeu avilamicina na dieta apresentou contagem significativamente menor em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta. Estudos de Burt et al. (2007) demonstraram efetividade do vapor de carvacrol, equivalente a 2 a 4 μ L de carvacrol puro, na inibição do crescimento de SE em carcaças de frango. O fato deste composto ser puro pode justificar a diferença daquele estudo em relação ao verificado neste trabalho.

Extratos vegetais e seus metabólitos secundários possuem efeito bactericida e bacteriostático dose-dependente sobre o organismo (bactérias, fungos, vírus e protozoários) (Smith-Palmer et al., 1998). O mecanismo pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antimicrobiano é por sua atividade na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas (Dorman e Deans, 2000). Segundo estes autores, o rompimento da parede celular ocorre devido ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas.

Apesar de, no presente estudo, os animais que receberam dietas contendo composto vegetal inicialmente (24 após a inoculação) não apresentar diminuição na contagem de *Salmonella*, após 72h de inoculação observou-se redução na excreção de *Salmonella* semelhante ao observado no grupo tratado com avilamicina. Na literatura refere-se que as bactérias Gram-negativas tendem a ser menos sensíveis aos óleos essenciais e extratos de plantas que as Gram-positivas. Isto porque elas possuem uma superfície hidrofílica, criando uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas como os óleos essenciais (Chao et al., 2000). Entretanto, como a maioria das bactérias presentes no intestino das aves são Gram-positivas, os óleos essenciais agindo sobre estas podem

permitir que o animal consiga combater melhor bactérias Gram-negativas, onde encontram-se classificadas as mais patogênicas. Desta forma pode-se sugerir o mecanismo do controle sobre excreção de *Salmonella* evidenciado neste trabalho, que somente ocorreu 72 horas mas não às 24 horas após inoculação.

Na avaliação histológica de duodeno e íleo (tabela 2 e 3), foi observado altura de vilos significativamente maior no grupo composto vegetal em relação ao controle, sendo similar ao grupo avilamicina no caso do duodeno, o que sugere melhor capacidade absorptiva. O número de células caliciformes no grupo composto vegetal foi significativamente maior no duodeno (Tabela 2), inclusive em relação ao grupo avilamicina, sendo confirmado pela menor relação vilos/células caliciformes, onde a cada 3,79 μm de altura de vilos foi observado uma célula caliciforme, enquanto que nos outros grupos essa relação foi de 4,54 e 4,16 para os grupos tratados com avilamicina e controle, respectivamente.

Essa maior população no número de células caliciformes no grupo tratado com composto vegetal provavelmente induz em maior quantidade de muco e isso pode ser importante para controlar bactérias patogênicas. De acordo com Amit-Romach et al. (2009), a redução na produção de muco possibilita melhores condições de adesão e proliferação de bactérias patogênicas em contrapartida da redução de bactérias benéficas ao organismo.

Ao se observar a relação vilos/cripta, verifica-se maior relação no grupo composto vegetal, no duodeno, sugerindo maior capacidade de renovação celular. Em relação à imuno-histoquímica, foi observado significativo aumento no número de células CD3⁺ no grupo que recebeu dieta com avilamicina comparado ao grupo submetido ao composto vegetal. Este resultado sugere menor resposta imune específica nos animais do grupo alimentado com composto vegetal. No ceco o menor número de células CD3⁺

é visto no grupo com avilamicina, porém não existe diferença quando comparamos os resultados de relação vilosidade/células CD3⁺. Na expressão de células CD3⁺ no ceco (Figura 1), sugere-se que a redução no número de contagem de colônias não afeta diretamente a população de células CD3⁺. Entretanto, existem outras bactérias ou desafios que podem estar relacionados a isto, como evidencia-se na Figura 3 B a presença de bastonetes.

Em adição, na histologia de ceco (tabela 4), foi observado altura de vilosidade significativamente maior no grupo controle em relação aos grupos avilamicina e composto vegetal. Como o ceco não tem função de absorção de nutrientes, este aumento de tamanho no vilosidade do grupo controle pode sugerir maior processo inflamatório, podendo haver edema neste órgão como sugere a eletromicrografia de varredura (figura 3 A). Em relação à profundidade de cripta, o grupo controle obteve a maior profundidade, seguido pelo grupo composto vegetal, sendo a menor no grupo avilamicina, indicando possível maior extrusão no vilosidade, necessitando de maior produção de células pela cripta, o que pode, ainda, estar relacionado a maior quantidade de bactérias isoladas e observadas na microscopia eletrônica de varredura neste tratamento (Figura 3 A e B) mostrando espesso muco e estrutura de bastonetes aderidos à mucosa o que contrasta com a mucosa do ceco limpa evidenciada nos outros tratamentos.

CONCLUSÃO

A utilização de composto vegetal e avilamicina diminuíram a excreção de *Salmonella* em aves 72 horas após a inoculação de 10⁵ UFC de *Salmonella* Enteritidis. A utilização de composto vegetal aumentou a relação vilosidade/células CD3⁺ no duodeno, em relação ao grupo avilamicina e controle, porém não teve efeito sobre a expressão destas células no ceco.

REFERÊNCIAS

- AMIT-ROMACH, E.; UNI, Z.; CHELED, S.; BERKOVICH, Z.; REIFEN, R. Bacterial population and innate immunity-related genes in rat gastrointestinal tract are altered by vitamin A-deficient diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.70-77, 2009.
- BRASIL. 2003. MAPA, Instrução Normativa nº6 publicada em 26 de agosto de 2003.
- BOPP, C.A.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALTER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM press, 2003. Cap.28, p.459-474.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.94, n.3, p.223-252, 2004.
- BURT, S.A.; FLEDDERMAN, M.J.; HAAGSMAN, H.P.; KNAPEN, F.; VELDHUIZEN, E.J.A. Inhibition of *Samonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. **International Journal of Food Microbiology**. v.119, p.346-350, 2007.
- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Grampositive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003.
- CHAO, S.C.; YOUNG, D.G.; OBERG, C.J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**. v. 12, p. 639-649, 2000.
- COX Jr., L.A. Potential human health benefits of antibiotics used in food animals: a case study of virginiamycin. **Environment International**. v.30, p.549-563, 2005.
- DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Serological and Bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**. v.60, p.259-269, 1998.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.308-316, 2000.
- FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Istituto Poligrafico e Zecco dello Stato, v.1, p.206-210, 1998.
- JEAUROUND, E.; SCHUMANN, B.; CLUNIES, M. et al. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v.80, p.394, 2002.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.813-829, 2003.
- MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SILVA, A.V.F.; BRUNO, L.D.G.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento do Trato Gastrointestinal de Embriões Oriundos de Matrizes Pesadas de 30 e 60 Semanas de Idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.2, p.141-148, 2000.
- MILTENBURG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p.87-100.

MIRANDA, J.M.; GUARDDON, M.; VASQUEZ, B.I.; FENTE, C.A.; BARROS-VELAZQUEZ, J.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M.; Antimicrobial resistance in enterobacteriaceae strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and conventional turkey meat: a comparative survey. **Food Control**, v.19, n.4, p.412-416. 2008.

NATIONAL RESEARCH CONCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9th rev.ed. National Academy Press: Washington, D.C. 1994.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.18, p.387-416.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O composto vegetal a base de óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha apresentou efeito tanto no controle da colonização por *C. perfringens* no ceco de aves inoculadas com *Eimeria* sp., na redução de enterites específicas causadas por *Eimeria maxima* e *E. tenella* nas aves 14 dias após a inoculação, quanto diminuindo a excreção de *Salmonella* em aves 72 horas após a inoculação de 10^5 UFC de *Salmonella* Enteritidis. Ainda, a utilização de composto vegetal aumentou a relação vilos/células CD3⁺ no duodeno, em relação ao grupo avilamicina e controle, porém não teve efeito sobre a expressão destas células no ceco.