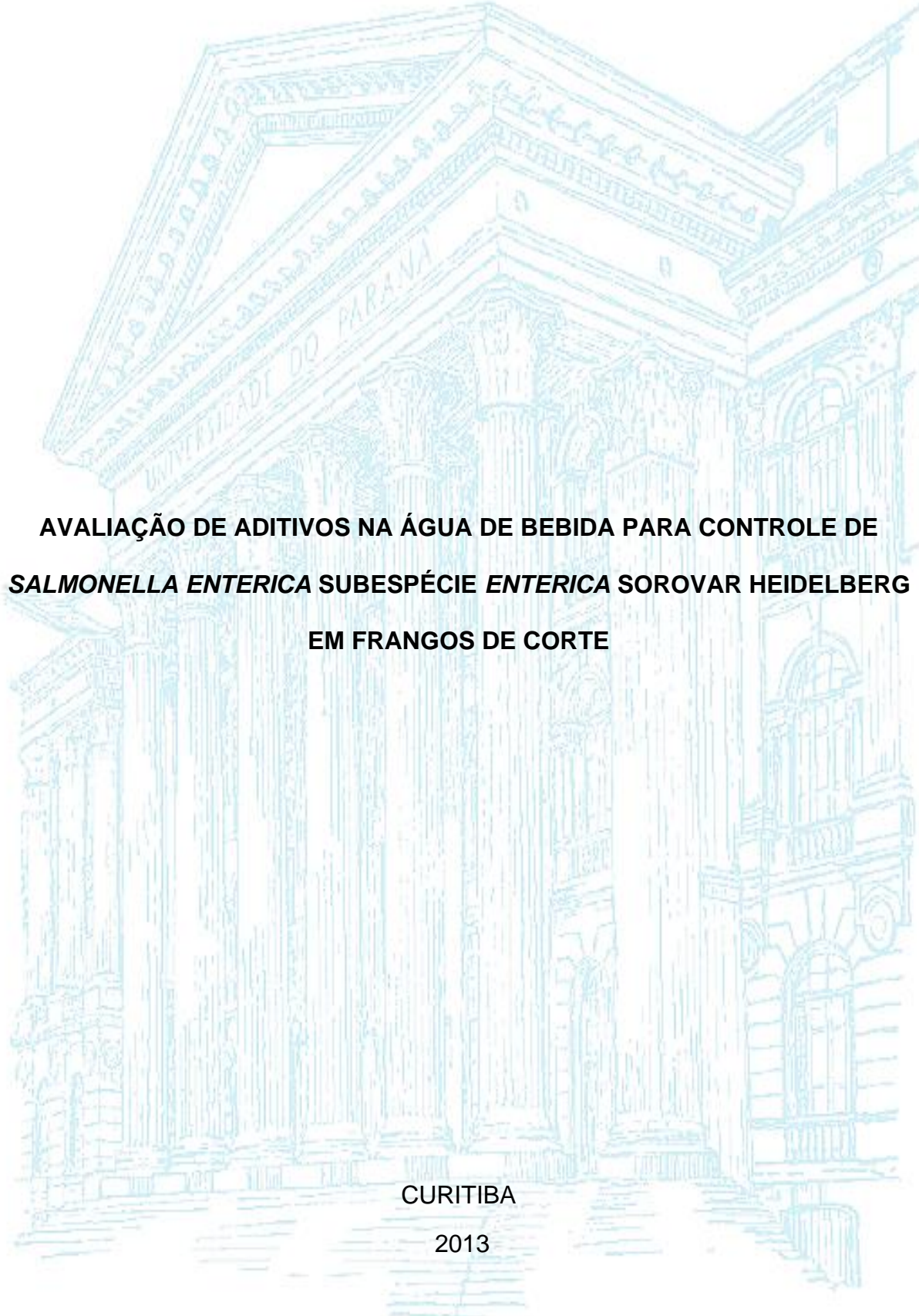


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HUMBERTO SCHIFFER CURY

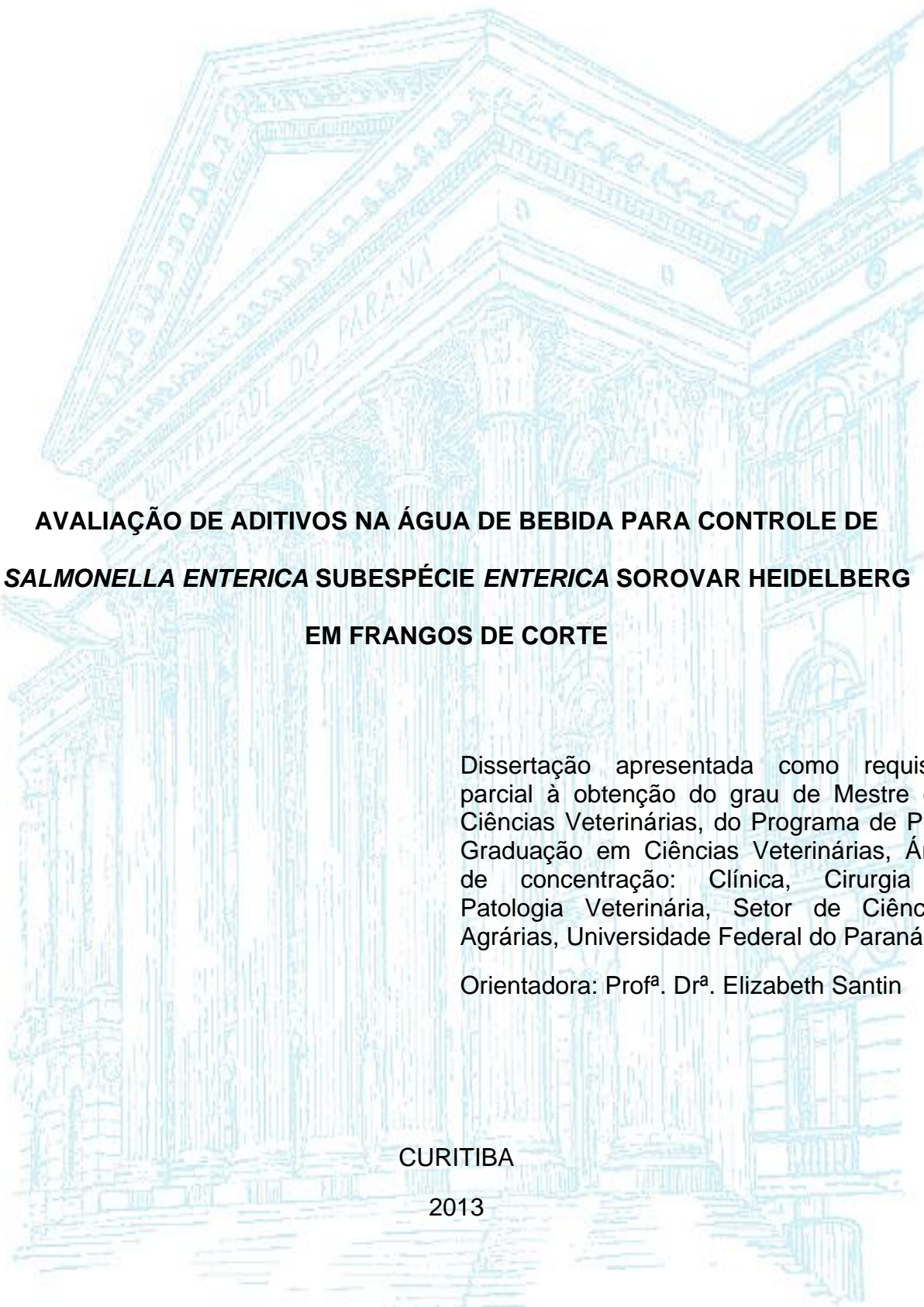


**AVALIAÇÃO DE ADITIVOS NA ÁGUA DE BEBIDA PARA CONTROLE DE
SALMONELLA ENTERICA SUBESPÉCIE *ENTERICA* SOROVAR HEIDELBERG
EM FRANGOS DE CORTE**

CURITIBA

2013

HUMBERTO SCHIFFER CURY



**AVALIAÇÃO DE ADITIVOS NA ÁGUA DE BEBIDA PARA CONTROLE DE
SALMONELLA ENTERICA SUBESPÉCIE *ENTERICA* SOROVAR HEIDELBERG
EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração: Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**AVALIAÇÃO DE ADITIVO EM ÁGUA DE BEBIDA PARA CONTROLE DE *Salmonella entérica* SUBESPÉCIE ENTÉRICA SOROVAR HEIDELBERG EM FRANGOS DE CORTE**” apresentada pelo Mestrando HUMBERTO SCHIFFER CURY declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato Aple para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2013.

Professora Dr. Elizabeth Santin
Presidente/Orientadora

Professor Dr. Rogério Ribas Lange
Membro

Professora Dr. Lucy Ono
Membro

Professor Dr. José Sidney Flemming
Membro

Dedico este trabalho ao meu pai, Ramis Gabriel Cury (in memoriam) que nos deixou no decorrer do curso do mestrado e aos meus filhos Bruno e Isabela Cury que também precisaram se distanciar de seu pai...

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo e a Nossa Senhora das Brotas, que por sua bondade e misericórdia me ajudaram a vencer as dificuldades do caminho.

À Professora Elizabeth Santin, que além de repassar seu vasto conhecimento, precisou de paciência e tolerância por ter um aluno ausente devido ao trabalho do dia a dia.

À empresa BRF e em nome de todos os colegas e superiores que supriram minha ausência no momento em que estava estudando. Especialmente ao gerente e amigo, Mauro Sérgio Souza, que auxiliou para que este sonho se realizasse. À equipe corporativa que esteve presente nas decisões e que colaborou sempre que necessitei, Alessandro, Keysuke, Mário Sérgio, Nelva, Patrícia e Renata.

Aos colegas de LABMOR, em especial à Andréia, Dani, Eduardo, Larissa, Mariana, Maristela e Patrick, e aos estagiários. Este trabalho é de vocês!

À minha mãe, Geny, grande guerreira, que nunca nos deixou desanimar. Aos meus irmãos Gabriel, Rosana e Simone e cunhados Mônica e Paul, pelo incentivo.

À Agrogen, em nome do colega Marciano André Vizzotto, pelo fornecimento das aves, ao Pedro Celso Machado Júnior, da empresa Impextraco, pela doação do ácido cáprico e Fernando Voese pelo fornecimento do extrato de ervas.

“Mas, lembra-te de teu Criador nos dias de tua juventude, antes que venham os maus dias e que apareçam os anos dos quais dirás: “Não sinto prazer neles”. Antes que a poeira retorne à terra para se tornar o que era; e antes que o sopro de vida retorne a Deus que o deu” (Eclesiastes 12:1 e 7).

“Se queres bem empregar tua vida, pensa na morte.”

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 1 – <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SUBESPÉCIE <i>ENTERICA</i> SOROVAR HEIDELBERG COMO CAUSA DE TOXINFEÇÃO EM SERES HUMANOS.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
<i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG E TOXINFEÇÕES EM SERES HUMANOS.....	19
<i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG EM AVES.....	21
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	22
FORMAS DE CONTROLE.....	23
PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS.....	24
ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	26
ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE ÁCIDO CÁPRICO E UM PRODUTO A BASE DE EXTRATOS DE ERVAS NO CONTROLE DE <i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG EM FRANGOS DE CORTE.....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39

INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	41
DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) DOS PRODUTOS TESTADOS.....	41
ÁCIDO CÁPRICO.....	42
PRODUTO DE EXTRATO DE ERVAS.....	42
EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	42
INSTALAÇÕES E ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	42
CEPA E DESAFIO.....	43
NECROPSIAS E COLETA DE AMOSTRAS.....	44
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	44
HISTOPATOLOGIA.....	45
IMUNOISTOQUÍMICA.....	45
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
RESULTADOS.....	47
CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	47
ANÁLISE DE <i>SALMONELLA</i>.....	47
HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA.....	49
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão da contagem de *Salmonella* Heidelberg no ceco aos 19 e 28 dias de idade. Comparação entre tratamentos e antes e após a utilização dos produtos (resultado expresso em Log₁₀)..... 47

Tabela 2. Presença de *Salmonella* Heidelberg no fígado e papo aos 19 e 28 dias. Comparação entre tratamentos e antes e após a utilização dos produtos..... 48

Tabela 3. Contagem de células CD4+, CD8+ e de células caliciformes no íleo e ceco das aves, nos diferentes tratamentos, aos 19 e 28 dias de experimento..... 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia do ceco das aves submetidas ao tratamento com extrato de ervas, aos 19 dias de vida (a) e aos 28 dias de vida (b), em relação a quantidade de células CD4+ (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X)..... 51

Figura 2 – Fotomicrografia dos cecos das aves submetidas ao tratamento com extrato de ervas, aos 19 dias de vida (a) e aos 28 dias de vida (b), em relação a quantidade de células caliciformes (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X)..... 51

Figura 3 – Fotomicrografia do íleo das aves submetidas ao tratamento com ácido cáprico, aos 19 dias de vida (a) e aos 28 dias de vida (b), em relação a quantidade de células caliciformes (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X)..... 52

RESUMO

A *Salmonella* Heidelberg (SH) tem sido relatada em aves comerciais em diversas partes do mundo como um dos mais prevalentes sorovares de *Salmonella* paratifóide. Esta bactéria tem causado graves toxinfecções em seres humanos devido ao consumo de ovos e produtos cárneos provenientes de aves infectadas. No Brasil, a SH tem se destacado devido ao seu crescente isolamento em aviários comerciais de frangos de corte, e pelo alto grau de dificuldade no controle e erradicação após sua instalação na propriedade. Além da biosseguridade aplicada na avicultura, formas alternativas de controle para *Salmonella* como ácidos orgânicos, probióticos e extrato de ervas estão sendo estudados. Frente a isto, esta dissertação foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro uma revisão sobre “*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg como causa de toxinfecção em seres humanos” e o segundo um experimento intitulado “Avaliação de ácido cáprico e um produto a base de extratos de ervas no controle de *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte”, onde foi evidenciada a capacidade do extrato de ervas em reduzir o isolamento de SH em papo e ceco de frangos infectados com este agente bacteriano.

Palavras-Chave: *Salmonella* Heidelberg, ácido cáprico, extrato de ervas.

ABSTRACT

Salmonella Heidelberg (SH) has been reported in commercial poultry in several parts of the world as one of the most prevalent serovars of paratyphoid. This bacterium has been causing severe toxoinfection in humans due to the consumption of eggs and meat products from infected poultries. In Brazil, *Salmonella* Heidelberg has been detached because of its increasing insulation in commercial poultry of broiler chicken, and for the high degree of difficulty in controlling and eradicating right after its installation in property. Beyond biosecurity applied to aviculture, different ways of controlling *Salmonella* as organic acids, probiotics and herbal extracts have been studied. According to the facts already mentioned, this dissertation has been split in two chapters. The first one is a review about “*Salmonella enterica* subspecie *enterica* serovar Heidelberg as cause of toxoinfection in humans” and the second is an experiment called “Capric acid evaluation and a herbal extract based product to control *Salmonella* Heidelberg in broiler chicken”, which evidenced the capacity of herbal extracts in decreasing the isolation of *Salmonella* Heidelberg in crop and caecum of infected poultries with this bacterial agent.

Key-words: *Salmonella* Heidelberg, capric acid, herbal extract

INTRODUÇÃO GERAL

A *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) é uma *Salmonella* paratífóide pertencente ao grupo B, e é um frequente agente de infecções de origem alimentar, sendo uma preocupação em saúde pública mundialmente (Davis et al., 2008; Nayak et al., 2007; Demczuk et al., 2004; Amavisit et al., 2001), por ocasionar infecções invasivas e mortalidade em seres humanos (Han et al., 2012). Os sintomas mais comuns de salmoneloses em seres humanos incluem diarreia, febre, cólicas abdominais que ocorrem de 12 a 72 horas após o consumo de alimentos de origem animal contaminados (CDC, 2010). A prevenção e o controle destas doenças são um grande desafio há alguns anos (Lahiri et al., 2010).

Em aves, o patógeno SH, não induz sinais clínicos, mas acarreta prejuízos na cadeia avícola devido a barreiras na exportação de produtos cárneos, aumento nos dias de vazio sanitário dos aviários contaminados e segregação e lavagem da planta frigorífica após o abate.

A preocupação com todos estes aspectos da salmonelose em seres humanos impõe que a cadeia avícola intensifique a biossegurança no processo de produção de carnes e ovos. Além disso, buscam-se ferramentas alternativas que possam auxiliar na prevenção e controle de SH na produção de aves, como é o caso do uso de ácidos orgânicos e extratos de ervas.

Ácidos orgânicos são amplamente utilizados na alimentação e água de bebida de frangos de corte como aditivos antibacterianos (Alali et al., 2013; Immerseel, 2006; Dibner e Buttin, 2002). Fitoterápicos são uma classe relativamente nova de aditivos para este controle. Há evidências que sugerem que alguns extratos de ervas são estimulantes de apetite além de conferirem efeitos antibacterianos (Jang et al., 2008; Botsoglou et al., 2004; Cowan et al., 1999). O modo de ação dos extratos de

ervas pode variar. Possíveis efeitos são a estimulação das enzimas endógenas, a regulação da microbiota normal do intestino e o efeito químico (baixar o pH intestinal) que podem ajudar a manter a saúde dos animais (Williams e Losa, 2002; Langhout, 2000). Embora numerosos estudos *in vitro* tenham demonstrado propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos extratos de ervas, ainda existem poucos dados *in vivo*.

Brenes e Roura (2010) sugerem que estudos destinados na avaliação de produtos naturais, como óleos essenciais e extratos de ervas são relevantes, uma vez que são conhecidas suas atividade antibacterianas, porém com número limitado de ensaios em animais.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi revisar conceitos relacionados a toxinfecção em seres humanos causada por SH e avaliar experimentalmente aves desafiadas com este sorovar e tratadas ou não com ácido cáprico e um produto à base de extratos de ervas via água de bebida.

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

REFERÊNCIAS

ALALI, W. Q.; HOFACRE, C. L.; MATHIS, G. F. et al. Effect of non-pharmaceutical compounds on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Food Control**, v. 13, p. 125-128, 2013.

AMAVISIT, P.; MARKHAM, P. F.; LIGHTFOOT, D. et al. Molecular epidemiology of *Salmonella* Heidelberg in an equine hospital. **Veterinary Microbiology**, v. 80, p. 85-98, 2001.

BOTSOGLOU, N. A.; CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P. et al. The effect of a mixture of herbal essential oils or α -tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. **South African Journal Animal Science**, v. 34, p. 52–61, 2004.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 1-14, 2010.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. What is salmonellosis, 2010.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology** v. 12, p. 564–582, 1999.

DAVIS, A. L.; CURTIS, P. A.; CONNER, D. E. Validation of cooking methods using shell eggs inoculated with *Salmonella* serotypes Enteritidis and Heidelberg. **Poultry Science**, v. 87, p. 1637-1642, 2008.

DEMCZUK, W.; AHMED, R.; ACKERMANN, H. W. et al. Morphology of *Salmonella* serovar Heidelberg typing phages. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 873-875, 2004.

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

HAN, J.; LYNNE, A.; DAVID, D. E. et al. DNA sequence analysis of plasmids from multidrug resistant *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates. **Food Research International**, v. 45, p. 628-633, 2012.

IMMERSEEL, V. F.; RUSSELL, J. B.; FLYTHE, M. D. et al. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35:3, p. 182-188, 2006.

JANG, A.; LIU, X. D.; SHIN, M. H. et al. Antioxidative potential of raw breast meat from broiler chicks fed a dietary medicinal herb extract mix. **Poultry Science**, v. 87, p. 2382–2389, 2008.

LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; IYER, N. et al. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 809-818, 2010.

LANGHOUT, P. New additives for broiler chickens. **World Poultry**, v. 16, p. 22–27, 2000.

NAYAK, R.; CALL, V.; KALDHONE, P. et al. Comparision of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg susceptibility testing results. **Clinical Medicine & Research**, v. 5, n. 2, p. 98-105, 2007.

WILLIAMS, P.; LOSA, R. Blending essential oils for poultry. **Feed Mix**, v. 10, p. 8–9, 2002.

CAPÍTULO 1

**“*SALMONELLA ENTERICA* SUBESPÉCIE *ENTERICA* SOROVAR HEIDELBERG
COMO CAUSA DE TOXINFECÇÃO EM SERES HUMANOS”**

INTRODUÇÃO

Em muitos países a Salmonelose é causa predominante de enfermidades transmitidas por alimentos, sendo o consumo de ovos e produtos cárneos os principais envolvidos em quadros de toxinfecções humanas (FAO/WHO, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2007), a classificação taxonômica atual esta baseada em estudos de hibridização de DNA dividindo o gênero *Salmonella* em apenas duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. Por sua vez, a *S. enterica* está subdividida em seis diferentes subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. No entanto o esquema de Kauffman-White baseado nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) diferenciam estas subespécies em milhares de sorovares sendo utilizados rotineiramente na identificação deste gênero. Na subespécie *S. enterica* foram identificadas 2.443 sorovares e entre estes inclui-se a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg. Os sorovares que causam doença em seres humanos estão classificados principalmente na espécie *S. enterica* subespécie *enterica* (FAO, 2010).

A subespécie *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) 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). Também está entre os sorotipos mais frequentemente isolados em ingredientes de origem animal e rações, ocupando a quarta posição entre os sorotipos associados a infecções em seres humanos nos Estados Unidos (Han et al., 2010). Segundo Menconi (2011) este sorovar está entre os três principais isolados de pessoas com toxinfecção alimentar por *Salmonella* na América do Norte, maior que em outras regiões do mundo. No Brasil, a SH foi isolada e é relatada desde 1962 em aves e

produtos de origem avícola (Borsoi et al., 2011), sendo o 9^a sorovar em ordem de maior prevalência no país ocorrendo, principalmente nas regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul. Entre estes, os estados do Sul aparecem com mais casos de isolamentos, sendo a SH, a 5^a *Salmonella* de maior prevalência na região (Freitas e Santos, 2011).

Tal como outras *Salmonellas* paratífóides, a SH é um patógeno de origem alimentar para seres humanos, existindo apenas relatos ocasionais de transmissão direta entre seres humanos ou de animal para seres humanos (Hennessy et al., 2004).

Embora a maior parte das infecções por *Salmonella* sejam auto limitantes em seres humanos e resolvam-se dentro de alguns dias, as toxinfecções por SH tendem a causar uma porcentagem desproporcionalmente alta de infecções invasivas, para as quais a terapia antimicrobiana é muitas vezes justificada, fazendo da resistência aos antibióticos uma preocupação. Sorovares resistentes têm sido isolados a partir de seres humanos, carnes e rações para animais (Han et al., 2010).

Preocupada com todos estes aspectos da salmonelose em seres humanos a cadeia avícola vem intensificando a biosseguridade no processo de produção de carnes e ovos. Além disso, buscam-se ferramentas alternativas que possam auxiliar na prevenção e controle de SH em aves como é o caso do uso de prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e extratos vegetais.

Objetiva-se através desta revisão abordar dados atualizados referentes a SH no que se refere à doença causada em seres humanos, resistência a antibióticos e possíveis controles alternativos em aves.

SALMONELLA HEIDELBERG E TOXINFECÇÃO EM SERES HUMANOS

Bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas na maioria dos países a principal causa de toxinfecções alimentares em seres humanos associadas ao consumo de produtos avícolas (Rodrigues et al., 2009). A SH é um sorovar pertencente a subespécie *Salmonella enterica enterica*, sorogrupo B e é altamente prevalente no Canadá e nos Estados Unidos, mas é raramente relatada em países europeus. No Canadá, a SH é classificada juntamente com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* como os três principais sorovares responsáveis pelos casos de salmoneloses humanas (Andrysiak et al., 2008).

Em investigações de infecções causadas por SH foram identificados alimentos como carne de frango, suíno, queijo cheddar e ovos associados à doença (Hennessy et al., 2004). Surtos de infecções em seres humanos por SH também podem ser associados ao consumo de produtos de aves, incluindo *nuggets* de frango e ovos (Andrysiak et al., 2008).

A SH é um importante patógeno animal que se tornou uma preocupação em Saúde Pública devido à sua patogenicidade em humanos. Pesquisa publicada pela Foodborne Diseases Active Surveillance Network (CDC, 2011) comparou o número de casos de doenças por contaminação alimentar em seres humanos nos Estados Unidos e demonstrou que as toxinfecções causadas por *Salmonella* corresponderam a 43,25% dos casos confirmados em laboratório e também foram maiores em números de internações (2.290 casos) e mortes (29 casos).

Com relação ao Brasil, não existem dados estatísticos oficiais nem extra-oficiais confiáveis sobre a ocorrência de toxinfecções alimentares causadas por

agentes presentes em carnes de aves e produtos avícolas industrializados (Sesti, 2004).

O período de incubação da doença em seres humanos é de aproximadamente 10 dias e em 47% dos casos são necessários atendimentos hospitalares (Currie et al., 2005). Porém, segundo o CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças do Governo Norte Americano (2011), a maioria das pessoas recupera-se sem tratamento. Infecções por *Salmonella* tendem a desenvolver febre, diarreia e cólicas abdominais 12 a 72 horas após a infecção. Trinta e três por cento dos casos apresenta diarreia sanguinolenta (Currie et al., 2005). Ainda, segundo Demczuk et al. (2003) as infecções por SH são associadas a sintomas de doenças graves, incluindo infecções extra-intestinais, septicemia e miocardite.

Infecções por *Salmonella* podem se espalhar dos intestinos para a corrente sanguínea e depois para outros locais do corpo podendo causar a morte se o paciente não for medicado rapidamente com antimicrobianos. Os adultos mais velhos, crianças e pacientes com comprometimento do sistema imune são mais susceptíveis a infecções graves por *Salmonella* (CDC, 2011).

Em um estudo populacional, Hennessy et al. (2004), verificaram que o principal fator de risco para a infecção esporádica com *Salmonella* foi o consumo de ovos preparados fora de casa. Estes autores sugerem que medidas de controle para diminuir a contaminação de ovos, poderiam reduzir substancialmente a incidência de infecção por SH em seres humanos. Entretanto, resultados do trabalho de Currie et al. (2005) indicam que *nuggets* e tiras de frango preparados em casa e ovos mal cozidos também foram envolvidos como fatores de risco para infecções endêmicas de SH no Canadá.

A relação de consumo de alimentos de origem animal contaminados com *Salmonella* também pode ser associada ao surgimento e propagação de cepas resistentes a antimicrobianos, devido a utilização destes na produção animal (Nayak, 2007).

O programa Canadense de Vigilância a Resistência Antimicrobiana descreve uma forte correlação entre cepas de *Salmonella* Heidelberg resistentes a Ceftiofur com a incidência de toxinfecção em seres humanos. A mudança nesta resistência aparece quando se reduz o uso de ceftiofur em incubatórios (Dutil et al., 2010).

SALMONELLA HEIDELBERG EM AVES

Ao longo dos anos, a SH ganhou destaque na produção de aves da América do Norte e em outros países (Borsoi et al., 2011). A SH é um dos cinco principais sorotipos mais comuns associados com a salmonelose humana e é normalmente um dos sorovares mais frequentemente isolados em frangos de corte e matrizes de postura, perus e suínos nos Estados Unidos e Canadá (Andrysiak et al., 2008; Foley e Lynne, 2008; Nayak et al., 2007).

As galinhas são geralmente infectadas com *Salmonella* através do trato gastrointestinal após a ingestão de fontes alimentares contaminadas. Estas, aderem-se e invadem através das células epiteliais da mucosa e em seguida disseminam-se sistemicamente para órgãos internos, incluindo o ovário e oviduto (Gast et al., 2005). Segundo Borsoi et al. (2011) as alterações na mucosa intestinal causada por SH são semelhantes as causadas pela *Salmonella* Enteritidis, e apesar de pintos desafiados com ambos sorovares permanecerem excretando bactérias nas fezes

por mais de 20 dias, aves infectadas com SH excretam menor quantidade de bactérias que aves desafiadas com *S. Enteritidis*.

Em estudo sobre o tempo de penetração da SH em ovos comerciais brancos e marrons, Raghianti et al. (2010), constatou que a bactéria atinge o interior do ovo branco em 2 horas e 16 minutos e em 2 horas e 44 minutos nos ovos de casca marrom.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Fatos preocupantes como o isolamento de cepas de *Salmonella* resistentes a drogas antimicrobianas, em aves de corte, estão sendo frequentemente relatados. Santos et al. (2000) realizaram um trabalho com carcaças de frangos congeladas, obtendo 32% de positividade. Nas amostras analisadas observaram resistência aos diversos antimicrobianos testados, concluindo que o uso indiscriminado dos antibióticos nos tratamentos das infecções das aves, contribui para a resistência entre os diferentes sorovares de *Salmonella*, indicando possível resistência cruzada com os patógenos humanos. No estudo de Lynne et al. (2009), foram testadas sensibilidades a antimicrobianos de 58 cepas de SH isoladas de frangos de corte, onde foi verificado que 72% das cepas apresentaram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados, enquanto 24% exibiram resistência conjunta a oito ou mais antimicrobianos. A resistência mais observada ocorreu com tetraciclina (71%), estreptomicina (62%) e kanamicina (52%).

Resultados não publicados obtidos no Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da UFPR no ano de 2012 evidenciaram, por meio do antibiograma, a resistência de todas as dez amostras de SH isoladas a partir de propé de cama de frangos para as tetraciclina e em 20% dos casos para espectinomicina e

lincomicina. Nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizados a partir destas SH isoladas, verificou-se resistência aos níveis recomendados para tratamento das aves para fosfomicina, enrofloxacina, lincomicina, espectinomicina e gentamicina.

Resistência bacteriana aos sanitizantes usados em abatedouros avícolas também foram documentadas. Colla et al. (2012) demonstraram que em amostras de SH isoladas em abatedouros e que eram sensíveis a Clorexidina e a Amônia Quaternária no ano de 2005, foram resistentes quatro anos após frente aos mesmos desinfetantes. Estes resultados indicam progressão da resistência bacteriana a estes sanitizantes e a necessidade de testes periódicos e alternância de princípios ativos nos programas de higienização dos frigoríficos.

A preocupação com cepas resistentes a antibióticos de sorovares de *Salmonella*, principalmente aquelas responsáveis por toxinfecções humanas tornou-se um desafio constante na produção avícola e, por isso, a procura de meios alternativos de controle estão sendo exaustivamente estudados.

FORMAS DE CONTROLE

A forma mais efetiva de controlar *Salmonella* nas aves e, conseqüentemente, em seus derivados utilizados para o consumo humano, se dá através de um criterioso programa de biosseguridade envolvendo todos os elos da cadeia avícola (reprodutoras, incubatórios, fábricas de ração, granjas e abatedouros).

Qualquer sistema de produção que queira controlar (obter baixa taxa de contaminação), erradicar (quando já contaminados) ou mesmo manter-se livre de algum sorotipo específico de *Salmonella*, jamais terá sucesso sem a implantação de

procedimentos de biossegurança direcionados ao controle da contaminação microbiana da ração final e/ou suas matérias primas (Sesti, 2004).

Aditivos medicamentosos alimentares para o controle de *Salmonella* incluem antimicrobianos de uso profilático e curativo, ácidos orgânicos, óleos essenciais, prebióticos, probióticos e simbióticos (Immerseel et al., 2003). Através da Instrução Normativa nº 65, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o governo brasileiro regulamentou o procedimento para o uso destes nas rações e restringiu a utilização de alguns antimicrobianos na produção de frangos de corte. Devido a isto, e concomitante a crescente preocupação com resíduos de medicamentos nas carcaças, que possam causar danos à saúde humana, os probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais de plantas estão sendo pesquisados mais intensamente nos últimos anos.

PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS

A utilização de microorganismos probióticos, substratos prébioticos que enriquecem certas populações bacterianas ou combinações simbióticas de probióticos e prebióticos (Patterson et al., 2003) têm sido estudadas para o controle de *Salmonella* em aves. Probióticos são microorganismos vivos que influenciam positivamente na melhora do balanço microbiano intestinal (Rahimi et al., 2009). Apesar de existirem dados publicados sobre a eficácia dos probióticos na redução da colonização intestinal por patógenos entéricos, os mecanismos de ação não são totalmente compreendidos (Menconi et al., 2011).

Uma variedade de gêneros microbianos são utilizados como probióticos, incluindo espécies de *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, leveduras e culturas mistas. Espécies de *Lactobacillus*

e *Bifidobacterium* são utilizadas mais frequentemente em seres humanos, enquanto que espécies do gênero *Bacillus*, *Enterococcus* e *Saccharomyces* são os microrganismos mais comumente utilizados na produção animal (Simon et al., 2001). No estudo de Knap, et al. (2011) a utilização de *Bacillus subtilis* em aves infectadas com *Salmonella* Heidelberg mostrou que o uso deste probiótico reduziu significativamente a carga de SH no trato intestinal dos frangos assim como no ambiente, diminuindo o risco de infecção entre as aves, bem como a possibilidade do patógeno contaminar as carcaças no abatedouro. No estudo de Menconi et al. (2011) o tratamento com probiótico de *Lactobacillus spp* na água reduziu significativamente a presença de SH em tonsilas e conteúdo cecal em 24 e 72 horas após o desafio em frangos de corte. Estudo de Lourenço et al. (2012) também demonstrou que o uso de *Bacillus subtilis* na ração foi capaz de diminuir o isolamento de *S. Minnesota* em frangos de corte desafiados.

Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis, que beneficiam o animal por estimular seletivamente o crescimento e a atividade biológica de uma ou poucas espécies de bactérias no intestino, melhorando a saúde do animal (Menten e Loddi, 2003). Carboidratos não digestíveis, como parede celular de plantas e leveduras estão classificados nesse grupo, pois são constituídos de complexo de glicomananoproteínas, em particular de mananoligossacarídeos, capazes de ligarem-se à fímbria das bactérias inibindo a colonização no trato gastrointestinal, podendo também ser utilizados como nutrientes pelas bactérias (Maiorka et al., 2001). Um dos oligossacarídeos mais pesquisados e de ação prebiótica são os mananoligossacarídeos (MOS), derivados da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Albino et al., 2006). Vários estudos têm

demonstrado que a prevenção da colonização de *Salmonella* em frangos pode ser alcançada com a utilização de prebióticos na ração (Babu e Raybourne, 2008; Donalson et al., 2008). Spring et al., (2000) desafiaram frangos de corte com dois tipos de *Salmonella* e encontraram menores concentrações destas bactérias no trato intestinal de aves suplementadas com MOS em relação ao tratamento controle.

ÁCIDOS ORGÂNICOS

Por definição, ácidos orgânicos são substâncias que apresentam uma carboxila na sua molécula. Assim, todos os ácidos graxos, e mesmo os aminoácidos, são ácidos orgânicos, além de muitas outras substâncias que se enquadram nesta classificação. Quando o termo ácido orgânico é empregado, subentende que trata-se de ácidos graxos voláteis de cadeia curta e que eventualmente podem ser chamados de ácidos fracos devido a menor proporção de carboxilas que os ácidos fortes (Penz, 1993).

Os ácidos orgânicos são comumente encontrados na natureza como componentes normais de tecidos vegetais e animais. Além disso, são formados através da fermentação microbiana no trato intestinal, constituindo parte importante do suprimento energético dos animais hospedeiros. Por esse motivo, foi estabelecido que os ácidos orgânicos possuem fortes propriedades e são amplamente utilizados na indústria alimentícia e de nutrição animal para controlar o crescimento de bactérias e fungos. Eles são utilizados com sucesso na dieta de leitões para prevenir distúrbios digestivos pós desmame, atuando por diversos mecanismos incluindo redução do pH intestinal, propriedades bacteriostáticas e diversos efeitos metabólicos da porção aniônica dos ácidos orgânicos após a dissociação (Bellaver, 2004).

Todo 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 seus hidrogênios para o meio, mais forte ele é considerado. É entendido por pK_a , o pH em que metade da substância se encontra na forma não dissociada. O ácido fórmico, por exemplo, tem um pK_a de 3,75, o que significa que em um meio com pH 3,75 metade do ácido está na forma dissociada e metade na forma não dissociada. Quando um ácido tem mais de um pK_a significa que tem mais de um próton para ser trocado. Isto aumenta a capacidade acidificante do composto (Lehninger, 2006).

O principal mecanismo de ação está relacionado à diminuição do pH do meio, assim ácidos orgânicos podem passar através das membranas bacterianas e dissociar-se no citoplasma para originar ânions e prótons. O acúmulo de ânions no citoplasma bacteriano tem sido demonstrado, ao menos parcialmente, como responsável pelos efeitos bactericidas dos ácidos orgânicos (Russell e Diez-Gonzalez, 1998).

Immerseel et al., (2004) estudaram os efeitos de microcápsulas de ácido acético, fórmico, propiônico e butírico incluídas na ração sobre a colonização de *Salmonella* Enteritidis no ceco, fígado e no baço de aves. Estes autores verificaram que a colonização foi significativamente maior com microcápsulas de ácido acético e menor com o ácido butírico. Ainda relataram que a eliminação fecal de *Salmonella* em aves infectadas foi reduzida quando o ácido butírico revestido foi utilizado como aditivo na alimentação de frangos de corte. Estes resultados indicam a existência de

outro mecanismo além da redução de pH para que ácidos de cadeia curta atuem sobre *Salmonella*.

Pickler et al., (2012) observou que os ácidos orgânicos reduziram significativamente a excreção de *Salmonella* Enteritidis no papo e ceco de frangos, porém foram pouco efetivos no controle de *Salmonella* Minnesota. Este fato levanta a hipótese que a efetividade dos ácidos orgânicos varia conforme o sorovar de *Salmonella*, e não foram encontrados na literatura estudos específicos sobre o efeito destes para SH.

Os ácidos orgânicos, se usados corretamente junto com medidas nutricionais, de manejo e biossegurança, podem ser uma boa ferramenta para manter a saúde do trato intestinal das aves, melhorando o rendimento zootécnico sem risco de resíduos na carne e ovos como os antibióticos (Pulici et al., 2008). Porém há necessidade de testes complementares para entender a efetividade destes para cada sorotipo de *Salmonella*.

ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são produtos vegetais voláteis extraídos por meio de vapor, destilação ou atividade enzimática sendo que alguns são produzidos sinteticamente. Atualmente são conhecidos aproximadamente 2.600 óleos essenciais e na sua maioria estes consistem de misturas de hidrocarbonetos, compostos oxigenados como álcool, ésteres, aldeídos e cetonas e uma pequena porcentagem de não voláteis, tais como resíduos de parafinas e ceras. Trabalhos sugerem que alguns destes componentes têm propriedades estimulantes do apetite, efeitos antibacterianos ou antioxidante (Zhang et al., 2005). Segundo Hoffman-Pennesi e Wu (2010), os óleos essenciais podem ser benéficos como aditivos

alimentares promovendo a saúde intestinal de frangos de corte e ajudando a reduzir o risco de infecções bacterianas. No relato de Scheuermann (2005), uma importante propriedade que têm se observado quando utilizam-se determinadas plantas aromáticas ou temperos é sua influência na atividade enzimática, com consequente melhora da digestibilidade de nutrientes. Possivelmente, o estímulo da digestão não se restringe à ativação das enzimas digestivas pancreáticas, havendo também contribuição de outros fatores como secreções gástrica, intestinal e biliar.

Muitas plantas apresentam propriedades benéficas derivadas a partir de componentes bioativos, porém podendo existir variações nas suas composições devido a fatores biológicos (espécie de planta, local de crescimento e condições de colheita), indústria (extração, destilação e estabilização) e condições de armazenamento (luz, temperatura, oxigenação e tempo) (Huyghebaert et al., 2011). A variação nos resultados *in vitro* da atividade antimicrobiana do óleo essencial pode estar relacionada ao clima e a região onde a planta foi cultivada (Celiktas et al., 2007), ao método de extração do óleo, ao volume do inóculo, à fase de crescimento, meio de cultura utilizado, pH do meio e tempo de incubação e temperatura (Rios et al., 1988). Com isto, cada “blend” de óleos essenciais e a concentração utilizada podem apresentar respostas diferentes frente a determinados sorovares de *Salmonella*.

O resultado do estudo de Amerah et al. (2012) demonstrou que a adição na ração de cinamaldeído pôde melhorar o desempenho de frangos de corte e contribuir para a segurança alimentar, diminuindo a incidência de transmissão horizontal de infecção por SH entre aves em 77% em comparação com o controle.

Nos resultados do experimento de Santurio et al. (2007) evidenciou-se a especificidade da atividade dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela sobre 20 sorovares de *Salmonella*, incluindo *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* e *S. Heidelberg*, sugerindo-se estudos adicionais para cada sorovar.

No trabalho de Bona et al. (2012) onde estudou-se a eficiência de um composto vegetal contendo óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta vermelha observou-se que as aves que receberam dietas contendo composto vegetal inicialmente (24 horas após a inoculação) não apresentaram diminuição na contagem de *Salmonella*, porém 72 horas após a inoculação observou-se redução na excreção de *Salmonella* semelhante ao que ocorreu no grupo tratado com avilamicina. Em estudo recente com aves desafiadas para SH e utilização de óleos essenciais, Alali et al. (2011), observaram que frangos que receberam óleos essenciais apresentaram redução significativa de SH e melhor ganho de peso comparativamente a outros tratamentos. Concluindo assim, que os óleos essenciais administrados via água de bebida podem controlar a contaminação de SH em papos de frangos de corte.

Quanto ao resíduo em carcaça dos compostos presentes nos óleos essenciais, Kohlert et. al (2000) relatam que os produtos do metabolismo, advindos da absorção dos princípios ativos, são transformados em compostos polares e excretados na urina, sugerindo que a rápida metabolização e a curta meia-vida dos compostos, causem um risco mínimo de acúmulo nos tecidos, quando comparados a antimicrobianos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Salmonella* Heidelberg tem sido relatada em aves comerciais em diversas partes do mundo como um dos mais prevalentes sorovares de *Salmonella* paratifóide. Esta bactéria tem causado graves toxinfecções em seres humanos devido ao consumo de ovos e produtos cárneos provenientes de aves infectadas. Devido a diversos estudos de resistência a antimicrobianos em seres humanos, sugere-se mais prudência no uso destes na avicultura.

Além da biosseguridade aplicada na avicultura, formas alternativas de controle para *Salmonella* como ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos e óleos essenciais estão sendo estudados.

Evidencia-se através desta revisão a necessidade do controle da SH nos plantéis de aves e a intensificação do estudo das formas alternativas de tratamento, já que em sua maioria, as variadas composições de ácidos orgânicos e óleos essenciais têm diferentes respostas aos diversos sorovares de *Salmonella* existentes.

REFERÊNCIAS

ALALI, W. Q.; HOFACRE, C. L.; MATHIS, G. F. et al. Effect of Plant-based Protein Meal Use in Poultry Feed on Colonization and Shedding of *Salmonella* Heidelberg in Broiler Birds. **Agriculture, Food and Analytical Bacteriology**, v. 1, p. 45-53, 2011.

ALBINO, L. F. T.; FERES, F. A.; DIONIZIO, M. A. et al. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 742-749, 2006.

AMERAH, A. M.; MATHIS, G.; HOFACRE, C. L. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and *Salmonella* colonization of broiler chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Poultry Science**, v. 91, p. 943-947, 2012.

ANDRYSIAK, A. K.; OLSON, A. B.; TRACZ, D. M. et al. Genetic characterization of clinical and agri-food isolates of multi drug resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Canada. **BMC Microbiology**, 2008.

BABU, U. S.; RAYBOURNE, R. B. Impact of dietary components on chicken immune system and *Salmonella* infection. **Expert Review Anti-Infective Therapy**, v.6, p. 121-135, 2008.

BELLAVER, C.; SCHEUERMENN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. In: Conferencia Avesui, 2004. **Anais...** p 1-16, 2004.

BONA, T. D. M. M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L. B. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 411-418, 2012.

BORSOI, A.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. et al. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 266-273, 2011.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Ground Turkey, 2011.

CELIKTAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v.100, n. 2, p. 553-559, 2007.

COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; DICKEL, E. L. et al. Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 32, p. 289-292, 2012.

CONSULTA MIXTA FAO/OMS DE EXPERTOS SOBRE LA EVALUACIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS A LOS PELIGROS MICROBIOLÓGICOS EN LOS ALIMENTOS. Caracterización del riesgo de *Salmonella* spp. en huevos y pollos para asar y de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, 2001

CURRIE, A.; MACDOUGALL, L.; ARAMINI, J. et al. Frozen chicken nuggets and strips and eggs are leading risk factors for *Salmonella* Heidelberg infections in Canada. **Epidemiology and Infection**, n. 133, p. 809-816, 2005.

DEMCZUK, W.; SOULE, G.; CLARK, C. et al. Phage-Based Typing Scheme for *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg, a Causative Agent of Food Poisonings in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4279-4284, 2003.

DONALSON, L. M.; MCREYNOLDS, J. L.; KIM, W. K. et al. The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal shedding in laying hens. **Poultry Science**, v. 87, p. 1253-1262, 2008.

DUTIL, L.; IRWIN, R.; FINLEY, R. et al. Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 48-54, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Expert Workshop on the Application of Biosecurity Measures to Control *Salmonella* Contamination in Sustainable Aquaculture, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations & WHO – World Health Organization. Risk characterization of *Salmonella* spp. in eggs and broiler chickens and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, p. 4, 2001

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

FREITAS, J. B.; SANTOS, A. Evolução de sorovares modelo de banco de cepas. **Seminário internacional sobre salmonelose aviária**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

GAST, R. K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P. S. The Relationship Between the Duration of Fecal Shedding and the Production of Contaminated Eggs by Laying Hens Infected with Strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. **Avian Diseases**, v. 49, p. 382-386, 2005.

HAN, J.; DAVID, D. E.; DECK, J. et al. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Human Patients with Those from Animal and Food Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1130-1133, 2011.

HENNESSY, T. W.; CHENG, L. H.; KASSENBERG, H. et al. Egg Consumption is the Principal Risk Factor for Sporadic *Salmonella* Serotype Heidelberg Infections: A Case-Control Study in FoodNet Sites. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 237-243, 2004.

HOFFMAN-PENNESI, D.; WU, C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal *Salmonella* population in broilers. **Poultry Science**, v. 141, n. 19, p. 432-443, 2010.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. V. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, n. 187, p. 182-188, 2011.

IMMERSEEL, V. F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F. et al. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 237-248, 2003.

IMMERSEEL, V. F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F. et al. Intermittent long-term shedding and induction in carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, v. 83, p. 1911-1916, 2004.

IMMERSEEL, V. F.; FIEVEZ, V.; DE BUCK, J. et al. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella* Enteritidis in young chickens. **Poultry Science**, v. 83, p. 69-74, 2004

IMMERSEEL, V. F.; RUSSELL, J.; FLYTHE, M. et al. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 182-188, 2006.

KOHLERT, C.; VANRENSEN, I.; MARZ, R. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. **Planta Medica**, v. 66, p. 495-505, 2000.

KNAP, I.; KEHLET, A. B.; BENNEDSEN, M. et al. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v. 90, p. 1690-1694, 2011.

LEHNINGER. **Princípios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, 4 edição, c. 2, p. 63-64, 2006.

LYNNE, A. M.; KALDHONE, P.; DAVID, D. et al. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella* enterica Serotype Heidelberg Isolated from Food Animals. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 2, p. 207-215, 2009.

LOURENÇO, M. C. **Efeito dos mananoligossacarídeos sobre a resposta imunológica de frangos de corte**. 2011. Curitiba, 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v. 3, n. 1, 2001.

MENCONI, A.; WOLFENDEN, A. D.; SHIVARAMAIAH, S. et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella* enterica serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, n. 90, p. 561-565, 2011.

MENTEN, J. F. M.; LODDI, M. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: Simpósio sobre nutrição de aves e suínos. **Anais...** Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, CBNA, p. 107-138, 2003.

NAYAK, R.; CALL, V.; KALDHONE, P. et al. Comparison of *Salmonella* enterica serovar Heidelberg Susceptibility Testing Results. **Clinical Medicine & Research**, v. 5, n. 2, p. 98-105, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, **WHO Collaborating Centre for reference and Research on *Salmonella***, v. 9, p. 1-166, 2007

PATTERSON, J.A; BURKHOLDER, K.M. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003.

PENZ, A. M. J.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação de aves. In: **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Porto Alegre, Anais. p.111-119, 1993

PICKLER, L.; HAYASHI, R. M.; LOURENÇO, M. C. et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de Frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2012.

PICKLER, L.; SANTIN, E.; SILVA, A. V. F. Alternativas aos antibióticos para equilibrar a microbiota gastrointestinal de frangos. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 3, p. 1-13, 2011.

PULICI, R. P. **Avaliação da resposta do uso da Exclusão Competitiva (CE) em desempenho e imunidade em frangos de corte**. 2008. Pirassununga, 53f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Curso de Pós- graduação em Nutrição e Produção Animal, Universidade de São Paulo.

RAGHIANTE, F.; ROCHA, T. S.; ROSSI, D. A. et al. Penetration Time of *Salmonella* Heidelberg Through Shells of White and Brown Commercial Eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 4, p. 273-277, 2010.

RAHIMI, S.; GRIMES, J. L. et al. Effect of a direct-fed microbial (Primalac) on structure and ultrastructure of small intestine in turkey poults. **Poultry Science**, v. 88, p. 491-503, 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2009.

RUSSELL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 205-230, 1998.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S.A. et al. *Salmonella* em carcaças de frangos congeladas. **Pesquisa Veterinária**, v. 20, 39-40, 2000.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, W. Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action. **Journal Animal Feed Science**, v. 10, p. 51-67, 2001.

SESTI, L. Biosseguridade em granjas de frangos de corte: Conceitos e princípios gerais. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura, **Anais...** 2004.

SCHEUERMANN, G. N.; JUNIOR, A. C. Perspectiva para a utilização de produtos de origem vegetal como aditivos alternativos na alimentação de aves. **Anais AVE EXPO Américas**, 2005.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A. et al. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella* challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, n.2, p.205-211, 2000.

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

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE ÁCIDO CÁPRICO E UM PRODUTO A BASE DE EXTRATOS DE ERVAS NO CONTROLE DE *SALMONELLA* HEIDELBERG EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO

A *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) é um dos principais sorovares isolados em aves no mundo e tornou-se de grande importância no Brasil devido seu crescente avanço em plantéis de frangos de corte, por seu difícil controle e erradicação nos aviários onde é identificada. Este sorovar foi relatado como causador de toxinfecção em seres humanos, sendo importante seu controle. Vários trabalhos demonstram efeitos benéficos quando da utilização de extratos de ervas assim como de ácidos orgânicos sobre a flora intestinal, prevenindo ou diminuindo a colonização por *Salmonella*. Este estudo tem como objetivo avaliar a eficiência de ácido cáprico e extrato de ervas na água de bebida para controle de *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte desafiados com este agente. Foram utilizados 120 pintos de corte divididos em 4 tratamentos: T1 controle não desafiado e não tratado, T2 desafiado e tratado com ácido cáprico, T3 desafiado e tratado com extrato de ervas e T4 controle desafiado não tratado. Os resultados demonstraram que aves que receberam ácido cáprico na água de bebida não controlaram a presença de SH e apresentaram diminuição no número de células caliciformes no íleo e significativo aumento de células CD4+ e CD8+ neste mesmo fragmento. As aves que receberam o tratamento com extrato de ervas apresentaram redução na contagem de SH no ceco e papo e aumento de células caliciformes, CD4+ e CD8+ no ceco.

ABSTRACT

Salmonella enterica serovars Heidelberg is one of the most isolated serovars in the world and has become of great importance in Brazil due to its growing development in broiler flock, for its hard control and eradication in aviaries which has been identified. This serovar was reported as the causer of toxoinfection in humans, being of huge importance its control. Many papers have shown beneficial effects of herbal extract use as well as organic acids in intestinal flora, avoiding or decreasing colonization by *Salmonella*. The aim of this study was to evaluate capric acid and herbal extract efficiency in drinking water in order to control *Salmonella* Heidelberg in broilers with this agent. 120 broilers chick were used in 4 different treatments: T1 neither challenged nor treated control, T2 treated and challenged with capric acid, T3 challenged and treated with herbal extract and T4 not treated challenged control. The results showed that poultries which received capric acid in drinking water did not control *Salmonella* Heidelberg and showed decrease in goblet cells in the ileum and significant increase of cells CD4+ and CD8+ in the same fragment. Poultries which received herbal extract treatment showed decrease in *Salmonella* Heidelberg count in crop and caecum and increased Goblet cells, CD4+ and CD8+ in their caecum.

INTRODUÇÃO

A subespécie *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) é uma das cinco salmonelas mais importantes associadas a toxinfecção em seres humanos, e uma das mais comumente isolada em galinhas, perus e suínos (Foley e Lynne, 2008; Han et al., 2010). Segundo Menconi (2011) este sorovar está entre os três principais isolados de pessoas com toxinfecção alimentar por *Salmonella* na América do Norte. No Brasil, a SH foi isolada e é relatada desde 1962 em aves e produtos de origem avícola, sendo o 9º sorovar em ordem de maior prevalência no país, ocorrendo principalmente nas regiões centro oeste, sudeste e sul (Freitas e Santos, 2011).

A forma mais efetiva de se controlar *Salmonella* nas aves, e, conseqüentemente, em seus derivados utilizados para o consumo humano, se dá através de um criterioso programa de biosseguridade envolvendo todos os elos da cadeia avícola. Aditivos medicamentosos alimentares para o controle de *Salmonella* incluem antimicrobianos de uso profilático e curativo, ácidos orgânicos, óleos essenciais, prebióticos, probióticos e simbióticos (Immerseel et al., 2003). Em adição, as restrições ao uso de alguns antimicrobianos na produção de frangos de corte, e a crescente preocupação com resíduos de medicamentos nas carcaças, têm estimulado pesquisas com outros princípios, em especial, o uso de ácidos orgânicos e extratos de ervas.

No que se refere aos ácidos orgânicos o principal mecanismo de ação descrito, segundo Russel e Diez-Gonzales (1998), está relacionado à diminuição do pH do meio intracelular, assim ácidos orgânicos podem passar através das membranas bacterianas e dissociar-se no citoplasma para originar ânions e prótons. O acúmulo de ânions no citoplasma bacteriano tem sido demonstrado, ao menos parcialmente, como responsável pelos efeitos bactericidas dos ácidos orgânicos.

Entretanto Pickler et al. (2012) demonstraram que ácidos orgânicos podem ter sua efetividade associada a vários fatores, entre eles o sorovar de *Salmonella*. Existem alguns relatos sobre eficiência de ácidos orgânicos para SH, porém não existem estudos avaliando o efeito do ácido cáprico sobre este sorovar de *Salmonella*.

Os aditivos fitogênicos de uso animal podem ser classificados como ervas (a planta toda ou suas partes) e botânicos (extratos e óleos essenciais) e, quando adicionados em rações, podem proporcionar melhor consumo de ração, aumento das secreções digestivas, atividades antioxidativas e a eubiose (condição de equilíbrio da microbiota saudável) do trato gastrintestinal dos animais (Gonzáles, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de ácido cáprico e uma formulação de extratos de ervas na água de bebida de frangos de corte para o controle de SH.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento *in vitro*

Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos produtos testados

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo para avaliação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do ácido cáprico e do extrato de ervas.

Utilizaram-se microplacas com 96 poços com volume de 0,1 a 0,2 mL. O inóculo foi preparado a partir de uma colônia pura de SH armazenada em Agar Nutriente (Oxoid®), incubada em caldo BHI (Oxoid®) a temperatura de 37°C por 24 horas. Esta suspensão bacteriana foi diluída em solução fisiológica 0,9% até atingir a

diluição correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Em cada orifício da microplaca adicionaram-se 100 µL de caldo Mueller Hinton (Oxoid®). Posteriormente, adicionou-se 100 µL do produto a ser testado e procederam-se diluições sucessivas deste. Em seguida, foram adicionados 10 µL da suspensão bacteriana à 10⁸ UFC em cada orifício. A microplaca foi incubada em estufa regulada a 37°C por 24 horas. Para o procedimento de leitura foi utilizado indicador de crescimento bacteriano TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) em solução de 1%. A CIM foi dada pela concentração mais baixa do produto testado que inibiu o crescimento da SH.

Ácido Cáprico

O ácido cáprico foi utilizado na forma líquida e pura. Por não ser possível realizar a diluição em água, precisou ser previamente diluído em solução de Tween 80 na proporção de 2 partes de ácido cáprico para 1 de Tween 80, para posteriormente ser diluído em água de bebida dos animais.

Produto de extrato de ervas

O produto a base de extrato de ervas utilizado foi formulado pelo LABMOR/UFPR e parceiros e encontra-se em fase de depósito de patente. Este produto apresentava-se na forma líquida e foi facilmente diluído em água.

Experimento *in vivo*

Instalações e animais experimentais

Foram alojados 120 pintinhos machos, com um dia de vida, de linhagem de matriz Cobb®, oriundos de aves livres de vacinação contra *Salmonella*.

No primeiro dia do experimento todas as aves foram pesadas, identificadas com anilha na membrana da asa e distribuídas de forma que o peso médio inicial fosse equivalente nos diferentes tratamentos. Os animais foram alojados em salas

desinfetadas, com pressão negativa e em cama de maravalha esterilizada em autoclave a 121° C por 15 minutos. Antes do experimento foram realizadas análises laboratoriais onde foi comprovada a ausência de *Salmonella* no ambiente de alojamento. No primeiro dia foram realizadas eutanásias e necropsias de cinco aves para determinar a ausência de *Salmonella* no papo, ceco e fígado dos animais.

As aves foram divididas em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos, cada um com 30 pintinhos de acordo com o quadro 1. Nos tratamentos 2 e 3, aos 25 dias de vida e 11 dias após o desafio, os animais foram tratados na água de bebida com os respectivos produtos até o 28º dia.

Os animais foram mantidos durante 28 dias com fornecimento de água e ração *ad libitum* em temperatura de conforto de acordo com o recomendado pelo manual da linhagem (Cobb, 2012).

Quadro 1. Descrição dos tratamentos experimentais.

Tratamento	Desafio	Princípio em água de bebida
T1	Não desafiado	-
T2	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Ácido Cáprico (1mL/L)
T3	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Extrato de ervas (8mL/L)
T4	<i>Salmonella</i> Heidelberg	-

Cepa e desafio

Para o preparo do inóculo usado no desafio, uma colônia pura de SH foi retirada do Ágar estoque e incubada em solução de BHI (Brain Heart Infusion) por 24 horas a 37°C. Em seguida, esta solução foi semeada com *swab* em uma placa de Agar Mueller Hinton por 24 horas a 37°C. A seguir, a placa foi lavada com solução de NaCl 0,85% esterilizada e diluída até alcançar a concentração correspondente à

escala 0,5 de MacFarland, a qual correspondeu à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de SH/mL (Pickler et al., 2012). Cada uma das diluições foi semeada em PCA (Plate Count Agar, Oxoid®) para certificação da contagem de colônias.

Aos 14 dias de vida todos os animais (exceto T1) foram desafiados por meio de sonda via oral com 1 mL de solução de SH na concentração 10^8 UFC/mL. Os animais do grupo não desafiado receberam solução salina esterilizada pela mesma via.

Necropsias e coleta de amostras

Foram realizadas necropsias e coletas de materiais de seis aves no 19º dia e de 10 aves no 28º dia do experimento. Amostras de papo, ceco e fígado foram coletadas de forma asséptica para contagem de colônias de *Salmonella*. Fragmentos de íleo e ceco foram coletados para análise histológica (células calciformes) e imunistoquímica (células CD4+ e CD8+).

Antes da eutanásia, os animais foram submetidos ao jejum alimentar de 8 horas conforme padrão em abatedouros de frangos de corte.

Análise microbiológica

Para realização do procedimento de contagem de *Salmonella* as amostras dos fragmentos de papo, ceco e fígado foram macerados e diluídos em água peptonada 2% em proporção de 1:9 (1 grama de fragmento para 9 mL de água peptonada). Retirou-se 1 mL da solução inicial de água peptonada 2% que foi pipetada em tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente, até a diluição 10^{-3} . Posteriormente, foram retirados 100 μ L de cada diluição que foram dispensados em placas em duplicata em meio verde brilhante com 1% de novobiocina, espalhando-se o líquido pela superfície da placa com uma alça de

vidro. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h e submetidas à posterior contagem das colônias (Pickler et al., 2012).

As soluções iniciais de água peptonada 2% foram incubadas a 35°C por 24h. Após esse período, transferiu-se 100µL de cada solução inicial para tubos com 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e 1 mL para um tubo contendo 10 mL de caldo Tetrionato, e incubados em estufa 42°C por 24h, para confirmação da presença ou ausência de *Salmonella* (Pickler et al., 2012).

Os resultados das contagens de colônias foram realizados seguindo os Procedimentos de Contagem de Colônias de acordo com a Normativa nº 62 publicada em 26 de agosto de 2003 (BRASIL - MAPA). Em todas as análises, amostras de cinco colônias por placa positiva foram colocadas em ágar Nutriente e enviadas à Fiocruz para sorotipificação dos sorovares e confirmação se eram SH.

Histopatologia

Os fragmentos de íleo e ceco foram acondicionados em frascos contendo solução de formol tamponado a 10%. Essas amostras foram submetidas a preparo de lâminas histológicas e coradas com Alcian Blue (Smirnov et al., 2004). Posteriormente foram submetidas à leitura em microscópio óptico e contagem de células caliciformes com leitura de 20 campos por grupo experimental em aumento de 100 X.

Imunoistoquímica

Para as análises de linfócitos CD4+ e CD8+, as amostras de íleo e ceco foram incluídas em gel Tissue-Tek O.C.T. (Miles, Elkhart IN, US), rapidamente congeladas em gelo seco e posteriormente mantidas desta forma em freezer. Foram seccionadas com 5 µm de espessura em um aparelho criostato e fixadas em lâminas

carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e proteína bloqueadora por 8 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech 1:100) e Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech 1:100), incubados por 90 minutos a 37°C. Para detecção da reação utilizaram-se anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação foi utilizado cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas (Jeurissen et al., 2000). Campos microscópicos com presença de células positivas foram quantificados em microscopia de luz com ampliação de 100X. Foram analisados 20 campos para cada grupo experimental e para cada marcador de superfície celular.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, e aqueles que apresentaram distribuição normal foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e posterior teste LSD a 5% de probabilidade. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste Kruscal-Wallis ($P < 0,05$). Os resultados foram comparados entre tratamento no mesmo período (19 ou 28 dias) e cada produto foi comparado dentro do mesmo tratamento antes e após o uso do produto. Resultados de microbiologia apresentados com presença/ausência foram submetidos ao teste de qui-quadrado ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Concentração inibitória mínima

O resultado de CIM para o ácido cáprico foi 0,48 mL/L e para o extrato de ervas 3,90 mL/L. Foram utilizados no experimento o dobro encontrado na CIM, portanto 1 mL de ácido cáprico para cada 1 litro de água de bebida e 8 mL de extrato de ervas para cada 1 litro de água de bebida.

Análise de *Salmonella*

Todas as amostras coletadas no primeiro dia de vida foram negativas para *Salmonella*. Na tabela 1 são observados os resultados de contagem de SH no ceco entre tratamentos no mesmo período e antes e depois do uso do produto dentro do mesmo tratamento. Aos 19 e 28 dias, somente o grupo não desafiado apresentou ($P < 0,05$) menor contagem de SH comparado aos demais tratamentos. Quando se avaliou dentro de cada tratamento, antes e depois da aplicação do produto, observou-se que aos 28 dias, depois de receber o produto, o tratamento com extrato de ervas reduziu significativamente a contagem de SH quando comparado ao que existia antes do uso do produto, mas isso não foi verificado com o ácido cáprico.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da contagem de *Salmonella* Heidelberg no ceco aos 19 e 28 dias de idade. Comparação entre tratamentos e antes e após a utilização dos produtos (resultado expresso em Log 10).

Tratamento	19 DIAS	28 DIAS
Controle não desafiado	0,000 b \pm 0,00	0,0000 \pm 0,00 b
Ácido Cáprico 1mL/L	4,276 \pm 1,04 a	4,457 \pm 0,69 a
Extrato de ervas 8 mL/L	5,418 \pm 0,66 A a	2,497 \pm 0,89 B ab
Controle desafiado	4,150 \pm 0,52 a	3,644 \pm 0,90 a

^{A,B} Médias significativamente diferentes ao teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$) na mesma linha.

^{a,b} Médias significativamente diferentes ao teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados de presença/ausência de SH em fígado e papo, já que não foi possível realizar a contagem de UFC nas amostras destes órgãos. Quando se avaliam os resultados entre tratamentos verifica-se que aves tratadas com ácido cáprico apresentaram maior positividade para SH em fígado aos 19 dias que os demais tratamentos. Aos 28 dias as aves do tratamento com extrato de ervas apresentaram menor positividade que os tratamentos desafiado e tratado com ácido cáprico, porém maior positividade que o grupo não desafiado, que foi totalmente negativo. Para amostras de papo aos 19 dias somente o grupo não desafiado foi negativo e significativamente diferente dos demais tratamentos. Aos 28 dias, aves do grupo tratado com ácido cáprico apresentaram maior positividade que os demais tratamentos. Quando se avaliou cada tratamento antes e depois da aplicação do produto, foi observado que o tratamento com ácido cáprico foi capaz de promover redução de amostras positivas no fígado (100% para 70%) após a utilização do produto, mas não apresentou este efeito no papo. No tratamento com extrato de ervas observou-se diminuição significativa na contagem de *Salmonella* no papo (83% para 40%), porém não foi observado o mesmo no fígado. As aves do controle desafiado apresentaram diminuição na contagem de UFC de SH no papo e aumento no fígado.

Tabela 2. Presença de *Salmonella* Heidelberg no fígado e papo aos 19 e 28 dias. Comparação entre tratamentos e antes e após a utilização dos produtos.

	19 dias		28 dias	
	Fígado	Papo	Fígado	Papo
Controle não desafiado	0/6 0 % c	0/6 0 % b	0/10 0 % c	0/10 0 % d
Ácido Cáprico 1mL/L	6/6 100 % Aa	6/6 100 % a	7/10 70 % Ba	10/10 100 % a
Extrato de ervas 8 mL/L	3/6 50 % b	5/6 83,33 % Aa	5/10 50 % b	4/10 40 % Bc
Controle desafiado	2/6 33,33 % Bb	6/6 100 % Aa	8/10 80 % Aa	8/10 80 % Bb

^{A,B} Médias significativamente diferentes ao teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$) na mesma linha.

^{a,b} Médias significativamente diferentes ao teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

Histopatologia e Imunoistoquímica

Nas avaliações de íleo, as análises demonstraram que aos 19 e aos 28 dias, aves do grupo controle desafiado apresentaram maior quantidade de células CD4+ e CD8+ que os demais tratamentos, e o grupo controle não desafiado apresentou a menor quantidade de células caliciformes comparado aos demais tratamentos. Quando se compara dentro de cada tratamento, antes e depois do uso do produto, verifica-se que o tratamento controle de aves desafiadas e tratadas com ácido cáprico aumentou, aos 28 dias, o número de células CD4+ e CD8+ comparado ao encontrado nestes mesmos grupos aos 19 dias, sendo que o grupo tratado com ácido cáprico diminuiu o número de células caliciformes enquanto o grupo controle desafiado não alterou o número dessas células entre os dois períodos. No grupo tratado com extrato de ervas verifica-se somente diminuição no número de células caliciformes aos 28 dias, sem alteração no observado aos 19 dias para células CD4+ e CD8+.

Nos fragmentos de ceco, foi observado que as aves do grupo desafiado apresentaram maior quantidade de células CD4+ e CD8+ que os demais tratamentos aos 19 dias. Aos 28 dias, as aves do grupo não desafiado apresentaram menor quantidade destas células CD4+ e CD8+ que os demais tratamentos. Quando se avaliou cada tratamento antes e depois da aplicação dos produtos verificou-se que os tratamentos controle desafiado, extratos de ervas e com ácido cáprico aumentaram a quantidade de células CD4+ aos 28 dias comparado ao que existia aos 19 dias. Porém, somente o grupo tratado com extrato de ervas aumentou as células CD8+ no ceco aos 28 dias comparado ao número existente destas células

aos 19 dias. O grupo não desafiado não apresentou alteração na presença destas células nos diferentes períodos.

Os resultados, aos 19 dias, entre tratamentos, demonstram aumento de células caliciformes nas aves do grupo com ácido cáprico em relação ao controle não desafiado, e o grupo de aves tratado com extrato de ervas, enquanto o grupo somente desafiado apresentou contagem destas células semelhante estatisticamente aos grupos tratado com ácido cáprico e extrato de ervas. Aos 28 dias, o tratamento com ácido cáprico apresentou maior quantidade de células caliciformes no ceco quando comparado ao controle não desafiado e também ao grupo desafiado. O grupo tratado com extrato de ervas apresentou contagem semelhante de células caliciformes no ceco a todos os demais tratamentos.

Tabela 3. Contagem de células CD4+, CD8+ e de células caliciformes no íleo e ceco das aves, nos diferentes tratamentos, aos 19 e 28 dias de experimento.

	ILEO						
	CD4+		CD8+		Caliciformes		
	19 dias	28 dias	19 dias	28 dias	19 dias	28 dias	
Controle não desafiado	4,15b	6,10b	3,90b	5,10b	48,75c	45,60b	
Ácido Cáprico	2,90 Bb	6,05 Ab	2,30 Bc	7,45 Ab	92,25 Aa	64,75 Ba	
Extrato de ervas	4,20b	4,95b	4,55b	5,40b	61,15 Abc	44,50 Bb	
Controle desafiado	5,70 Ba	9,05 Aa	6,90 Ba	11,45 Aa	76,30ab	64,30a	
	CECO						
	Controle não desafiado	7,00 a	4,95 b	3,20 ab	2,55 b	3,85 b	4,85 b
	Ácido Cáprico	2,50 Bbc	7,70 Aa	3,95 a	5,95 a	7,00 a	7,10 a
	Extrato de ervas	3,80 Bb	8,00 Aa	2,20 Bb	7,55 Aa	2,20 Bb	5,50 Aab
	Controle desafiado	2,20 Bc	8,50 Aa	4,50 a	5,80 a	4,80 ab	4,85 b

^{A,B} Médias significativamente diferentes ao teste de LSD ($P \leq 0,05$) na mesma linha.

^{a,b,c} Médias significativamente diferentes ao teste de LSD ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

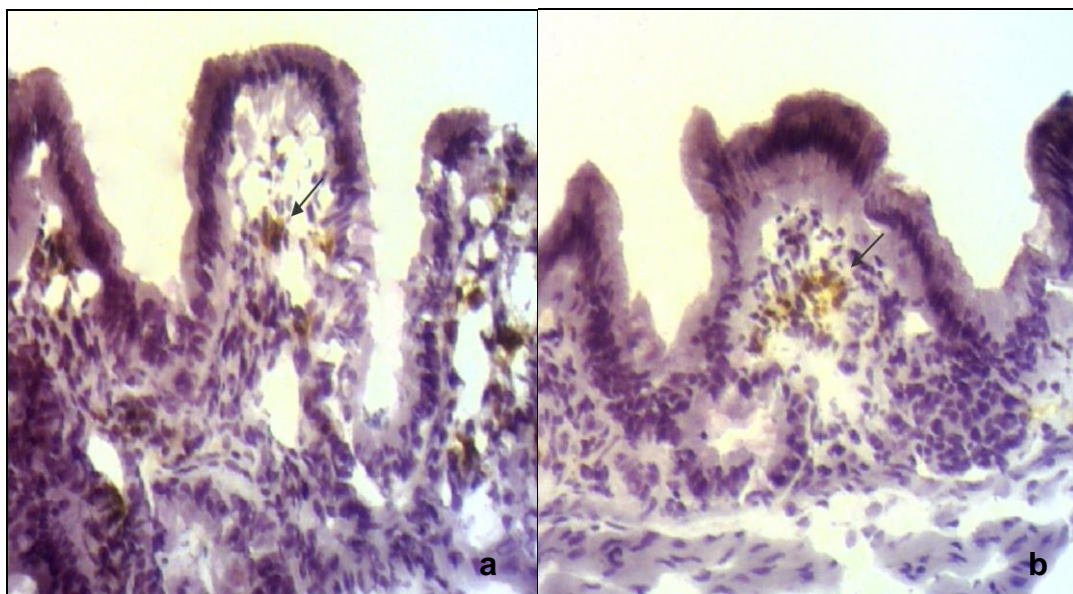


Figura 1 – Fotomicrografia do ceco das aves do tratamento com extrato de ervas, aos 19 dias de vida (a) e aos 28 dias de vida (b), em relação a quantidade de células CD4+ (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X).

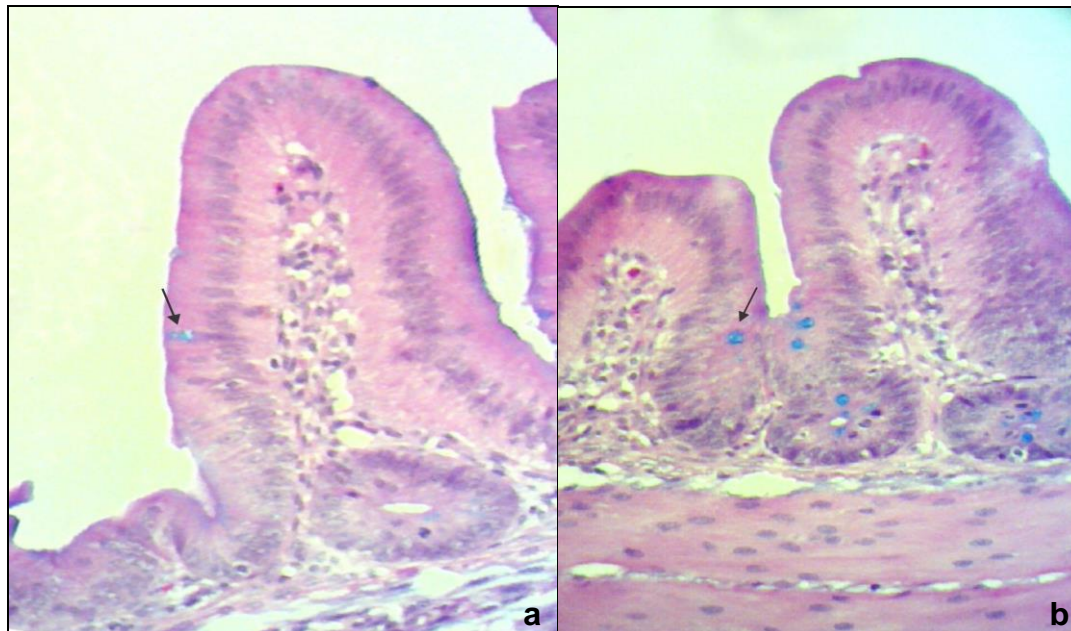


Figura 2 – Fotomicrografia dos cecos das aves do tratamento com extrato de ervas, aos 19 dias de vida (a) e aos 28 dias de vida (b), em relação a quantidade de células caliciformes (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X).

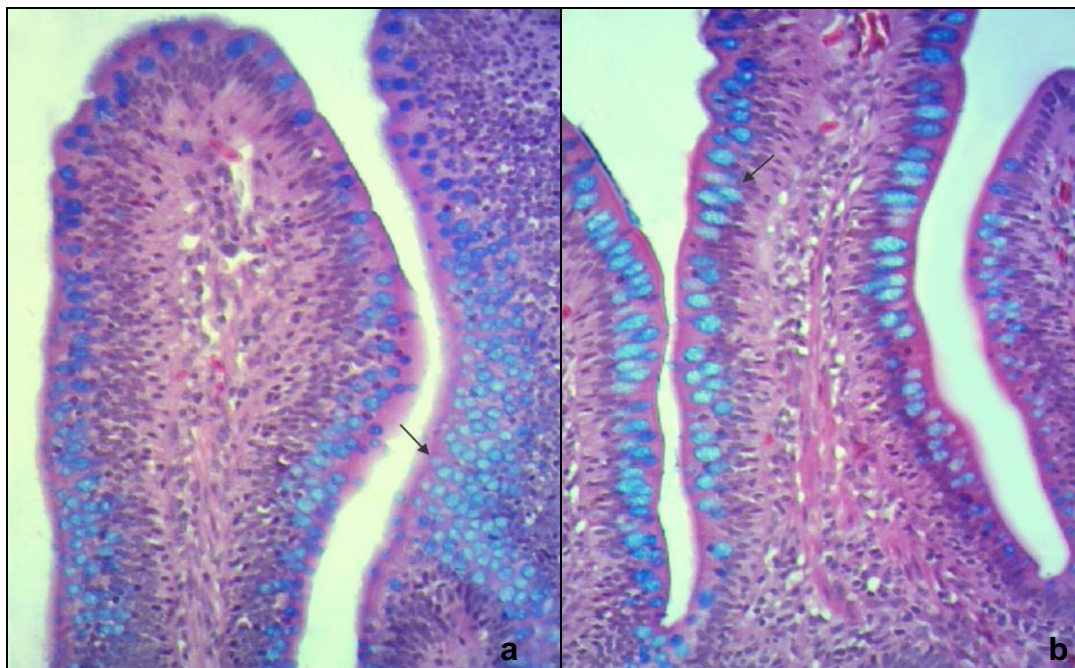


Figura 3 – Fotomicrografia do íleo das aves do tratamento com ácido cáprico, aos 19 dias de vida (a) e aos 28 dias de vida (b), em relação a quantidade de células caliciformes (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X)

DISCUSSÃO

Os resultados microbiológicos realizados no primeiro dia do experimento comprovaram a negatividade das aves e dos equipamentos para *Salmonella*, assim como todas as amostras do tratamento negativo, demonstrando a boa condução do experimento. Todas as colônias enviadas para tipificação confirmaram ser de SH.

Apesar do ácido cáprico ter apresentado eficácia na redução de SH na análise *in vitro*, quando se realizou a análise *in vivo*, este produto não foi eficaz em controlar SH nas amostras analisadas, comparado ao grupo controle desafiado, mesmo sendo utilizado o dobro da dosagem inibitória mínima calculada pela CIM. Quando se avalia os resultados histológicos, também se verifica que o comportamento foi semelhante entre o grupo tratado com ácido cáprico e grupo controle desafiado nos segmentos intestinais analisados.

Segundo Le (2005) a única forma de garantir que os ácidos orgânicos sejam efetivos, principalmente, que cheguem ativos as partes inferiores do trato gastrintestinal, como o ceco, é protegendo-os dentro de uma matriz que tenha capacidade de passar intacta pela região anterior do trato digestório, sem ser inativado. Isto também pode ser comprovado através do trabalho de Lesson (2006), que afirma que para se alterar o pH cecal, deve-se recorrer ao uso de ácidos orgânicos de cadeia curta protegidos. Piva et al. (2007) também verificou que a mistura de ácidos orgânicos (fumárico, málico, cítrico e sórbico) protegidos através do processo de microencapsulação com gordura, apresentaram uma lenta liberação dos ingredientes ativos no intestino dos animais, prevenindo a rápida dissociação dos ácidos orgânicos. O fato do produto utilizado não apresentar nenhuma proteção, como descritas nos estudos acima, podem ser um indicativo que justifique a falta de sua estabilidade para controle de *Salmonella* no ensaio *in vivo*.

As análises microbiológicas demonstraram que o extrato de ervas utilizado mostrou-se efetivo na diminuição das contagens de SH no papo e ceco. A falta de efetividade no fígado pode estar relacionada a necessidade de contato do produto com a bactéria para que este efeito ocorra. Como as aves já eram positivas para SH quando iniciou-se o uso do produto, especula-se que o efeito do mesmo ocorra no lúmen intestinal não tendo efeito para tratamento sistêmico.

A *Salmonella* é considerada como agente patogênico intracelular e como resultado a imunidade mediada por células T desempenha um papel importante proporcionando proteção contra a infecção. A imunidade das células T é mediada e regulada por CD4+ (células T auxiliares) e CD8+ (células T citotóxicas) (Holt, et al., 2010). O marcador celular CD4+ é uma glicoproteína de superfície expressa

principalmente como um monômero nas células T e timócitos, mas também sobre os macrófagos e células dendríticas. O marcador celular CD8 é uma glicoproteína de superfície expressa em células T citotóxicas (Powell et al., 2009). A proporção CD4+/CD8+ pode ser utilizada para fornecer um padrão de observação nas alterações do estado imune durante a doença (Wang et al., 2003; Liu et al., 2002). Além disso, Lourenço (2011) descreve que em situações de desafio por *Salmonella*, ocorre uma relação inversa entre o número de linfócitos T (células CD3+) e a expressão de células caliciformes na mucosa intestinal.

No presente estudo, o grupo controle desafiado apresentou aumento de CD4+ no íleo e ceco e de CD8+ no íleo e diminuição de células caliciformes nestes segmentos, justificando essa capacidade do desafio com SH atrair CD4+ e CD8+ para a região destes segmentos intestinais, e que existe relação inversa entre presença de linfócitos e células caliciformes na mucosa intestinal descrita por Lourenço (2011). Este comportamento também foi observado no grupo tratado com ácido cáprico, que não teve efeito sobre o controle desta *Salmonella*.

No grupo tratado com extrato de ervas, apesar deste produto ter apresentado redução no isolamento de SH, continuou-se evidenciando aumento de células CD4+ e CD8+ no ceco, semelhante ao que ocorreu no grupo controle positivo, assim como aumento de células caliciforme neste mesmo fragmento. Com este fato especula-se que a ação do extrato de ervas no aparelho digestório pode estar induzindo a resposta imune, possivelmente devido a algum fator particular das ervas utilizadas.

O controle de *Salmonella* tem sido descrito na literatura para várias plantas como pitanga (Rodrigues et al., 2005); pau-rosa e pimenta-da-jamaica (Marinho et al., 2005); tomilho (Stelato e Resende, 2009), jambolão (Loguercio et al., 2005); coentrilho (Simionatto et al., 2004); hortelã-branca (Stüker et al., 2005); orégano e

tomilho (Santurio et al., 2007, Bona et al., 2012), mas pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação. Infelizmente por questões confidenciais de patente não será possível especular sobre qual seria o mecanismo de ação do extrato de erva utilizado no presente estudo. Entretanto, verifica-se que apesar de diminuir a presença de SH em ceco e papo das aves, o extrato de ervas na água de bebida não diminuiu a presença de células imunológicas como CD8+ no íleo e ceco dos animais, o que seria esperado caso o efeito fosse somente antimicrobiano. É possível que o extrato de ervas utilizado também tenha algum efeito sobre a imunidade local das aves. Kwon et al. (2009) verificaram que a canela-falsa inibiu significativamente, *in vitro* e *in vivo*, a expressão de fatores pro-angiogênicos, aumentou a atividade antitumoral das células T CD8+ pelo aumento de moléculas citolíticas e sua atividade citotóxica. Shan et al. (1999) demonstraram que extrato de ervas chinesas aumentaram a atividade de células T citotóxicas em ensaios com linfócitos de seres humanos *in vitro*.

São necessários maiores estudos para melhor entender o mecanismo de ação e aplicabilidade do produto de ervas estudado. Da mesma forma, outros ensaios *in vivo* protegendo o ácido cáprico são necessários para verificar sua capacidade antimicrobiana *in vivo* sobre SH.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no experimento demonstraram a baixa eficiência da utilização do ácido cáprico *in vivo*, no controle de SH em papo e ceco de frangos de corte desafiados.

O extrato de ervas avaliado apresentou resultados positivos na diminuição da contagem de SH no papo e no ceco de frangos de corte, podendo ser recomendado como alternativa de controle de SH em aves.

REFERÊNCIAS

BONA, T. D. M. M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L. B. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 411-418, 2012.

COBB. Suplemento: Desempenho e nutrição para frangos de corte, revisado em abril de 2012.

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

FREITAS, J. B.; SANTOS, A. Evolução de sorovares modelo de banco de cepas. **Seminário internacional sobre salmonelose aviária**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

HAN, J.; DAVID, D. E.; DECK, J. et al. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Human Patients with Those from Animal and Food Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1130-1133, 2011.

HOLT, P.S.; VAUGHN, L.E.; GAST, R.K.; Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133, p. 276-281, 2010.

IMMERSEEL, V. F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F. et al. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 237-248, 2003.

JEURISSEN, S. H. et al. Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infectious micro-organisms and the concurrent immune response of the host. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 141-151, 2000.

KWON, H-K. K. et al. Cinnamon extract suppresses tumor progression by modulating angiogenesis and the effector function of CD8+ T cells. **Cancer Letters**, v. 278, p. 174-182, 2009.

LE, N.Y. Use of organic acids in poultry production. Mode of action and applications. **I Fórum internacional de avicultura**. Foz do Iguaçu, p. 158-164, 2005.

LESSON, S. Temas de interés presentes y futuros em nutrición de aves. **XXII Curso de Especialización FEDNA**, p. 143-150, 2006.

LIU, C.C.; HUANG, K. J.; YEH, T. M. et al. Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 68, p. 241-252, 2002.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, nº.2, p.371-376, 2005.

LOURENÇO, M. C. **Efeito dos mananoligossacarídeos sobre a resposta imunológica de frangos de corte**. 2011. Curitiba, 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós- graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

MARINHO, S. C. et al. Aplicação do óleo essencial do pau rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) como agente antibacteriano. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, III, 2005. Campinas, SP. **Palestras**: Instituto Agrônomo de Campinas, p. 76, 2005.

MCCARTNEY, E. O banimento de antibióticos promotores de crescimento na UE – Implicações globais para a nutrição animal. **IX Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Anais**, p. 13-33, 2008.

MENCONI, A.; WOLFENDEN, A. D.; SHIVARAMAIAH, S. et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella* enterica serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, n. 90, p. 561-565, 2011.

PICKLER, L.; HAYASHI, R. M.; LOURENÇO, M. C. et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de Frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2012.

PICKLER, L.; SANTIN, E.; SILVA, A. V. F. Alternativas aos antibióticos para equilibrar a microbiota gastrointestinal de frangos. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 3, p. 1-13, 2011.

PIVA, A.; PIZZMIGLIO, M.; MORLACCHINI, M.; TEDESCHI, M.; PIVA, G. Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 486-493, 2007.

POWELL, F.; LAWSON, M.; ROTHWELL, L.; KAISER, P. Development of reagents to study the turkey's immune response: Identification and molecular cloning of turkey CD4, CD8 and CD28. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 540-546, 2009.

REVOLLEDO, L. Alternativas para o controle de *Salmonella*. **IX Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Anais**, p. 95-110, 2008.

RODRIGUES, M. V. P. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da *Eugenia uniflora*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, III, 2005. Campinas, SP. **Palestras: Instituto Agrônomo de Campinas**, p. 12, 2005.

RUSSELL, J.B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances in Microbial Physiology** v.39, p. 205-230, 1998.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SHAN, B. E.; YOSHIDA, Y.; SUGIURU, T. et al. Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes in vitro. **International Journal Immunopharmacology**, v. 23, p. 149-159, 1999.

SIMIONATTO, E. et al. **Estudos dos constituintes químicos de óleos voláteis de plantas medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação e modificação estrutural e atividade biológica**, 2004.

STELATO, M. M.; RESENDE, B. M. Atividade de óleos essenciais de plantas utilizadas na culinária sobre bactérias patogênicas ou deteriorantes de alimentos. In: **XIV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUC-CAMPINAS**, 2009.

STÜKER, et al. Isolamento e identificação do principal constituinte de *Mentha rotundifolia* e avaliação de sua atividade antimicrobiana. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS**, v. III, 2005.

SMIRNOV, A. D. et al. Mucin dynamics in the chicks small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 736-742, 2004.

WANG, H. H.; LIN, C. Y.; HUANG, T. P. Patterns of CD4/CD8 T-cell ratio in dialysis effluents predict the long-term outcome of peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 18, p. 1181-1189, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ácidos orgânicos têm sido utilizados em larga escala na avicultura industrial devido sua ação no controle de *Salmonella*. Porém, dentre os vários sorovares existentes, e frente aos diversos ácidos orgânicos disponíveis, avaliações precisam ser realizadas, para que o ácido orgânico a ser utilizado seja efetivo frente ao sorovar de *Salmonella* que se deseja controlar. No presente estudo, o ácido cáprico não apresentou resultados satisfatórios quando frangos de corte foram desafiados com SH.

Os extratos de ervas ainda têm pouca utilização em frangos de corte, porém com o crescente banimento de vários princípios ativos antimicrobianos, têm se realizado estudos com as mais diversas ervas. Neste trabalho, pode-se comprovar o efeito positivo do “blend” de extrato de ervas testado em aves desafiadas com SH. As diminuições de contagem de SH no papo e ceco podem auxiliar a indústria avícola, já que estes órgãos são grandes responsáveis por contaminações em abates frigoríficos.