

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTO DE  
EXCLUSÃO COMPETITIVA COMO ALTERNATIVA AOS  
ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NA CRIAÇÃO DE  
PERUS DE CORTE**

**ELISANE LENITA MILBRADT**

**Botucatu-SP**

**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTO DE  
EXCLUSÃO COMPETITIVA COMO ALTERNATIVA AOS  
ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NA CRIAÇÃO DE  
PERUS DE CORTE**

**ELISANE LENITA MILBRADT**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Elisane Lenita Milbradt

**USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTO DE EXCLUSÃO COMPETITIVA  
COMO ALTERNATIVA AOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NA CRIAÇÃO  
DE PERUS DE CORTE**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho  
Presidente e Orientador  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Edivaldo Antônio Garcia  
Membro  
Departamento de Produção Animal  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior  
Membro  
Departamento de Microbiologia e Imunologia  
IB – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque  
Membro  
Departamento de Nutrição e Produção Animal  
FMVZ – USP - Pirassununga

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles  
Membro  
Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal  
FMV – UNESP - Araçatuba

12 de julho de 2013.

*Caminhar, sem nunca esquecer que...*

*Para ser grande, sê inteiro: nada*

*Teu exagera ou exclui.*

*Sê todo em cada coisa. Põe quanto és*

*No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda*

*Brilha, porque alta vive.*

*Fernando Pessoa*

### OFEREÇO

*A meu pai Erni Alberto Milbradt (in memoriam) e minha avó*

*Emma Amanda Milbradt (in memoriam)*

*Das palavras duras, o ensinamento;*

*Das atitudes, o exemplo;*

*Orgulho-me de vocês e sempre estarei no caminho que vocês me mostraram. Obrigada!*

### DEDICO

*A minha mãe, Lenita Frantz Milbradt,*

*o pouco de ontem, hoje é tudo.*

*Obrigada mãe!*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor e Orientador Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho, pela orientação e pela oportunidade concedida para realização do curso.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – (Processo nº 2011-07752-2) pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro concedido (Processo nº 2010-20655-3).

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, pela oportunidade de realização deste trabalho e também pela amizade e respeito aos alunos.

Ao aluno do curso de Mestrado, ex-residente do Laboratório de Ornitopatologia, João Rodrigues Zamae, pela imprescindível e fundamental ajuda na execução do experimento.

Ao Professor do Departamento de Produção Animal, FMVZ/UNESP – Botucatu, Dr. Edivaldo Antonio Garcia, pelo empréstimo de equipamentos e instalações, conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao Professor do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ/UNESP – Botucatu, Dr. Adriano Sakai Okamoto, pela colaboração na execução dos experimentos.

Ao Professor do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB/UNESP – Botucatu, Dr. João Pessoa de Araújo Júnior, pelo empréstimo dos equipamentos, instalações, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos alunos de graduação e pós-graduação da FMVZ/UNESP – Botucatu, Cristiane Sanfelice, Milena Coppola, Daniele Rodrigues, Lucimara Centenaro, Henrique Centenaro, Bárbara Fernandes, Vanessa Carvalho, Guilherme Marietto, Ana Angelita Sampaio Baptista e Tais Donato, pela ajuda na execução do experimento.

Às colegas Isadora Mainieri e Larissa Quinto, pelo apoio no exame de qualificação.

A todos colaboradores da Fábrica de Ração e Setor de Avicultura da FMVZ/UNESP – Botucatu, especialmente ao Sr. Antônio Carlos Godoi, pela grande ajuda na condução dos experimentos, pela amizade, paciência e pelo companheirismo.

Ao Setor de Vigilância da Fazenda Lageado, especialmente aos servidores que atendem a Fazenda Experimental Edgárdia da FMVZ/UNESP – Botucatu, pela ajuda, atenção, carinho e zelo com que desempenharam sua função durante a execução do experimento.

A empresa BRF – Brasil Foods Alimentos S.A, pelo fornecimento de comedouros e bebedouros.

Ao amigo e ex-colega Evandro Carlos dos Santos, pela ajuda na aquisição dos perus.

A empresa DSM, pelo fornecimento do suplemento vitamínico utilizado na formulação das rações.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação em Medicina Veterinária, pela amizade, respeito e educação dedicados a mim e a todos os alunos da pós-graduação.

A todos que contribuíram de alguma forma para a execução desse trabalho e não foram citados nominalmente, muito obrigada!

**LISTA DE TABELAS**

<b>CAPÍTULO 2</b>	Página
Tabela 1. Composição percentual e estimada das dietas experimentais.....	27
Tabela 2. Média do peso corporal, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade de perus de corte tratados com lincomicina, ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva.	28
Tabela 3. Mediana e valores mínimo e máximo da concentração dos ácidos acético, propiônico e butírico no conteúdo cecal.....	29
Tabela 4. Média de erro padrão médio da altura dos vilos dos diferentes segmentos intestinais no 28° e 70° dia de vida das aves.....	30
 <b>CAPÍTULO 3</b>	
Tabela 1. Composição percentual e estimada das dietas experimentais.....	51
Tabela 2. Mediana e valores mínimo e máximo dos resultados de quantificação de ácidos graxos voláteis (AGVs) no conteúdo cecal.....	52
Tabela 3. Incidência, mediana e valores mínimo e máximo dos resultados de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de SE segundo grupo experimental e local pesquisado.....	53



## LISTA DE FIGURAS

**CAPÍTULO 3**

Página

- Figura 1. Valores de quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. no conteúdo do inglúvio de perus em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração)..... 54
- Figura 2. Valores de quantificação relativa de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo do inglúvio em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração)..... 55
- Figura 3. Valores de quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. no conteúdo do ceco de perus em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração)..... 56

- Figura 4. Valores de quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. no conteúdo do ceco de perus em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração); **EC-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de produto EC ( $10^9$ UFC/L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Ácido Org.-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de ácidos orgânicos (1,5 kg/1000L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Control. Pos.:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento..... 57
- Figura 5. Valores de quantificação relativa de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo do ceco em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração)..... 58
- Figura 6. Valores de quantificação relativa de DNA de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo do ceco em: As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental; **CE-água:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento, administração de produto EC ( $10^9$ UFC/L) via água de bebida, 120h antes do abate; **EC-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de produto EC ( $10^9$ UFC/L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Ácido Org.-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de ácidos orgânicos (1,5 kg/1000L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Control. Pos.:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento..... 59

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
Introdução.....	2
Revisão de literatura.....	3
Microbiota intestinal de aves.....	3
<i>Salmonella</i> em perus.....	4
Uso de aditivos na alimentação animal.....	6
Exclusão competitiva.....	7
Ácidos orgânicos.....	8
Proposta do estudo.....	10
<b>CAPÍTULO 2</b>	
USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTO DE EXCLUSÃO COMPETITIVA COMO ALTERNATIVA AO ANTIBIÓTICO COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO NA CRIAÇÃO DE PERUS DE CORTE	11
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	16
Aves, instalações e equipamentos.....	16
Manejo alimentar e dietas experimentais.....	16
Variáveis analisadas.....	17
Desempenho.....	17
Quantificação de ácidos graxos voláteis (AGVs).....	17
Mensuração da altura dos vilos intestinais.....	18
Análise estatística.....	18
Resultados.....	19
Discussão.....	20
Referências Bibliográficas.....	23

### CAPÍTULO 3

CONTROLE DE <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS EM PERUS DE CORTE POR MEIO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTO DE EXCLUSÃO COMPETITIVA.....	31
Resumo.....	33
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Cepa de <i>Salmonella</i> Enteritidis e desafio.....	36
Aves, instalações e equipamentos.....	37
Manejo alimentar, sanitário e dietas experimentais.....	37
Delineamento experimental.....	38
Parâmetros avaliados.....	39
Análise estatística.....	41
Resultados.....	41
Discussão.....	43
Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas.....	47

### CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL.....	61
Conclusão geral.....	62
Referências Bibliográficas.....	63

**RESUMO – MILBRADT, E. L. Uso de ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva como alternativa aos aditivos antimicrobianos na criação de perus de corte.** Botucatu, 2013. 70p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Com objetivo de avaliar o uso de ácidos orgânicos (AOs) e produto de exclusão competitiva (EC) como alternativa ao antimicrobiano como promotor de crescimento, foram realizados dois experimentos. O primeiro objetivou avaliar a influência dos produtos no desempenho zootécnico, pH do conteúdo do inglúvio e ceco, altura dos vilos intestinais e produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) no ceco. Na primeira semana de vida, os AOs influenciaram negativamente os parâmetros de desempenho. Na fase de engorda, o consumo de ração e conversão alimentar do grupo que recebeu AO foi inferior ao dos demais grupos. As aves que receberam AOs e produto de EC apresentaram concentrações mais elevadas de ácido propiônico, aos 14 dias, e ácido butírico aos 28, 56 e 70 dias de vida. Os valores de pH e altura dos vilos intestinais não foram influenciados pelos tratamentos. O segundo experimento objetivou avaliar a influência dos AOs e produto de EC, administrados continuamente na ração e temporariamente na água, sobre a produção de AGVs no ceco, população de bactérias do gênero *Lactobacillus* e da família *Enterobacteriaceae* e desafio de *Salmonella* Enteritidis (SE). A administração contínua dos ácidos orgânicos e produto de EC influenciou positivamente a quantidade de *Lactobacillus* no inglúvio e ceco, elevou a concentração de ácido butírico e reduziu a quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e a contaminação por SE no ceco. Não houve efeito da administração dos tratamentos via água de bebida sobre a concentração de AGVs, contaminação de SE no inglúvio e ceco. A suplementação contínua de AOs e produto de EC resultou em excelente desempenho zootécnico e reduziu a colonização SE no ceco, demonstrando serem alternativas viáveis ao uso dos antimicrobianos.

Palavras chave: desempenho, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Salmonella* Enteritidis

**ABSTRACT - MILBRADT, E. L. Use of organic acids and competitive exclusion products as an alternative to antimicrobial additives in the rearing of commercial turkeys.** Botucatu, 2013. 70p. Thesis (Ph.D.) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

To evaluate the use of organic acids (OAs) and product of competitive exclusion (CE) as an alternative to antimicrobial growth promoter, two experiments were conducted. The first aimed to evaluate the influence on the performance of the products, the pH content of the crop and cecum, intestinal villous height and production of volatile fatty acids (VFAs) in the cecum. In the first week of life, the OAs negatively influenced the performance parameters. In the fattening phase, feed intake and feed conversion in the group receiving OAs was lower than the other groups. Birds that received OAs and product EC showed higher concentrations of propionic acid, at 14 days, and butyric acid at 28, 56 and 70 days of life. The pH and intestinal villous height were not affected by treatments. The second experiment evaluated the influence of the OAs and CE product, administered continuously in the diet and temporarily in the water, on the production of VFAs in the cecum, the population of bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Enterobacteriaceae* and challenge of *Salmonella* Enteritidis (SE). Continuous administration of OAs and CE product increased the concentration of butyric acid and reduced contamination by SE in the cecum. There was no effect of management treatments in drinking water on the concentration of VFAs, SE contamination in crop and cecum. The continuous supplementation of OAs and CE product resulted in excellent growth performance and reduced SE colonization in the cecum, showing that they are viable alternatives to the use of antimicrobials.

**Key words:** *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, performance, *Salmonella* Enteritidis

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## INTRODUÇÃO

A indústria avícola brasileira tem demonstrado extraordinário crescimento durante as últimas décadas. Em 2011, o Brasil assumiu o posto de terceiro maior produtor mundial de carne de perus, perdendo apenas para Estados Unidos (EUA) e União Europeia (UE) (UBABEF, 2012). Para atender o grande crescimento na demanda do produto, faz-se necessário intensificar, cada vez mais, o sistema de produção avícola. Entre outros fatores, uma das alternativas para a melhora da eficiência produtiva é a utilização de antimicrobianos em dosagens subclínicas objetivando promover resultados significativos no desempenho, melhorando os índices zootécnicos e maximizando a produção (JONES e RICKE, 2003). O mecanismo de ação dos antimicrobianos, também denominados promotores de crescimento, ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que sua atuação ocorre sobre a microbiota intestinal dos animais, provavelmente inibindo o metabolismo bacteriano e reduzindo a competição entre bactérias e hospedeiro (ANDERSON et al., 1999).

O uso de antibióticos, na alimentação animal, como promotores de crescimento é prática comum, desde a década de 50 (JONES e RICKE, 2003). Em 1951, Starr e Reynolds, publicaram um dos primeiros relatos de resistência bacteriana em perus de corte alimentados, experimentalmente, com dieta acrescida de estreptomicina. Posteriormente, surgiram vários relatos de resistência aos antibióticos de isolados de *Escherichia coli* e bactérias do gênero *Salmonella* (EVANGELISTI et al., 1975; GUSTAFSON et al., 1997 e FAIRCHILD et al., 1998).

Acredita-se que o uso contínuo de antibióticos, como promotores de crescimento, pode induzir a resistência bacteriana em animais e também em humanos, pela ingestão de resíduos desses compostos em produtos de origem animal (SMITH, 2011). Além disso, existem evidências que os genes de resistência aos antibióticos podem ser transmitidos da microbiota animal para a humana (GREKO, 2001). Esses fatores reforçados pela pressão da opinião pública têm levado alguns países a banirem o uso desses produtos da alimentação animal (CASTANON, 2007).

Em 2006, a UE proibiu o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento. Essa decisão pode comprometer a eficiência dos sistemas intensivos de produção, sustentada em grande parte pela utilização de antibióticos como promotores de crescimento ou como preventivos de doenças infecciosas (SMITH, 2011). Com isso, novos produtos como enzimas, probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e produtos de



exclusão competitiva (EC), os quais podem promover o equilíbrio da microbiota intestinal, têm sido empregados com o objetivo de otimizar o desempenho produtivo das aves e a qualidade do produto final, sem riscos à saúde pública.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Microbiota intestinal de aves*

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) é uma mistura de bactérias, fungos e protozoários, mas as bactérias são os microrganismos predominantes (GABRIEL et al., 2006) e, dentre elas, as Gram + estão em maior número (SAVAGE, 1977). Animais jovens são expostos a uma sucessão de população microbiana no TGI. Acredita-se que o TGI das aves passe a ser colonizado por microrganismos antes da eclosão (PEDROSO et al., 2005). Após a eclosão, a colonização é mais acentuada, pois a ave entra em contato com os microrganismos da casca do ovo e do meio externo (VERSTEGEN et al., 2005).

Existe uma diversidade significativa na população bacteriana nos diferentes segmentos do TGI. Cada região do TGI tem um perfil microbiológico, o qual se torna mais complexo quando a ave atinge a idade adulta (GONG et al., 2007;. van der WIELEN et al., 2002). De modo geral, o ingluvívio, moela, duodeno, jejuno e íleo são colonizados, predominantemente, por bactérias do gênero *Lactobacillus*, sendo que as espécies *L. aviaries* e *L. salivarius* são predominantes (GONG et al., 2007). Os cecos são um local de fermentação, por isso concentram a maior parte das bactérias do trato gastrointestinal das aves (APAJALAHTI, 2005). Nesse segmento predomina a colonização por bactérias da família *Clostridiaceae* (*Faecalibacterium prausnitzii*), *Ruminococcus* e também *Lactobacillus* (LU et al., 2003; GONG et al., 2007).

O estabelecimento e manutenção de uma microbiota saudável tem custos e benefícios para o hospedeiro. Um dos maiores benefícios é a resistência à colonização por microrganismos patogênicos, fenômeno conhecido como exclusão competitiva. O mecanismo específico que determina a proteção não é totalmente conhecido, mas acredita-se que seja pela produção de substâncias antimicrobianas como ácidos graxos voláteis pela microbiota residente ou pela competição por nutrientes e sítios de ligação na mucosa intestinal (SNEL et al., 2002). O custo associado aos benefícios proporcionados pela microbiota pode incluir a competição com o hospedeiro por nutrientes, secreção de metabólitos tóxicos e indução de resposta inflamatória no trato

intestinal (SNEL et al., 2002). Todos esses eventos incorrem em gastos energéticos, o que pode reduzir o desempenho animal (VERSTEGEN et al., 2005).

### ***Salmonella* em perus**

A salmonelose é uma das mais importantes zoonoses veiculadas por alimentos. *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST) são os principais sorovares associados a casos da doença em humanos (CALENGE et al., 2010). Constituído por mais de 2500 sorotipos, o gênero é responsável por perdas econômicas consideráveis nos plantéis animais e na saúde pública, sendo considerado um dos principais agentes etiológicos das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (POPOFF et al., 2004).

Entre os alimentos veiculadores do patógeno para o homem, os produtos avícolas, dentre eles os ovos e carcaças de aves, figuram como os mais importantes (EFSA, 2011). Assim como qualquer outro produto derivado de aves, carne e derivados de peru também são fontes de contágio de *Salmonella*. Casos de salmonelose têm sido causados pelo consumo de carne de peru preparada incorretamente (GREIN et al., 1999; EFSA, 2011).

Uma extensa lista de sorovares isolados de criações comerciais de perus, nos EUA é descrita por Hafez e Jodas (2000), sendo que dentre os principais estão: *Salmonella* Heidelberg, *S. Hadar*, *S. Senftenberg*, *S. Newport*, *S. Reading*, *S. Bredeney*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Enteritidis*, *S. Meleagridis* e *S. Saintpaul*. Dos 20 sorovares relacionados a casos de salmonelose humana, cinco são comumente isolados de perus, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Montevideo*, *S. Saintpaul* e *S. Agona* (CDC, 2006).

Uma revisão do número de sorovares isolados de perus, nos últimos 20 anos, demonstrou grande diversidade nos sorovares predominantes em cada ano (FOLEY et al., 2007). Isso se deve, principalmente, ao sistema de criação de perus dos EUA ser altamente integrado, 65% da produção do país esta centralizada em pouco mais de 800 fazendas, cada uma com mais de 100 mil aves. Se um sorovar infectar uma dessas unidades, rapidamente é disseminado, influenciando a prevalência anual (USDA, 2004). No entanto, segundo CDC (2006), *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg* e *S. Hadar* são os sorovares predominantes nas últimas décadas. Segundo o USDA (2007) a porcentagem de lotes de perus de corte positivos para *Salmonella* foi reduzida em 60% do ano de 1996 a 2006, graças a implementação do programa de controle PR-HACCP (*Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point*).

Na UE, um programa nacional obrigatório para controle de *Salmonella*, em matrizes e perus de corte, entrou em vigor em janeiro de 2010, esse foi implementado em conformidade com os Regulamentos (CE) n° 2160/2003, 584/2008.18 e 213/2009.19. A prevalência de *Salmonella* spp. em lotes de perus de corte em 2011 foi de 10,1%, menor em relação à 2010, quando a prevalência foi 12,1%. Em 2011, a prevalência de SE em animais prontos para o abate foi de 0,1% e 9,6% para *Salmonella* spp (EFSA, 2011).

Durante o abate e processamento das carcaças, a *Salmonella* proveniente do trato digestório de aves infectadas pode ser fonte de contaminação para outras carcaças e toda a linha de abate (ROSTAGNO et al., 2006). Embora UE, EUA e Brasil, grandes produtores de aves, especialmente perus, tenham implementado programas de controle de *Salmonella*, pouco se sabe sobre a epidemiologia da bactéria em perus de corte, principalmente em idade de abate (ROSTAGNO et al., 2006).

O jejum pré-abate, a apanha, o carregamento, o transporte, a espera e o manuseio das aves no abatedouro são práticas comuns na indústria avícola. Apesar de necessárias, essas práticas também são consideradas fontes estressoras. Em frangos, alguns autores demonstraram que a exposição a fatores estressantes, principalmente aqueles relacionados ao manejo pré abate, aumentam a colonização e, conseqüentemente, a transmissão da *Salmonella*, devido à eliminação da bactéria no ambiente (HOLT et al., 1998). Porém, Rostagno et al. (2006) demonstraram que essas práticas não têm efeito sobre a prevalência de contaminação por *Salmonella* em perus de corte. A explicação mais óbvia seria devido à idade avançada das aves, enquanto frangos são abatidos com sete semanas, perus podem ser abatidos com até 23 semanas de vida. Estudos demonstram que a complexidade da microbiota intestinal aumenta com o avanço da idade, bem como a resposta do sistema imune contra bactérias como a *Salmonella* (BEAL et al., 2005).

O ceco é considerado um dos principais reservatórios de *Salmonella* em frangos (FANELLI et al., 1971). Yamamoto et al. (1961), demonstraram que essa é uma afirmativa válida também para perus de corte. Embora o jejum alimentar seja utilizado para reduzir a quantidade de conteúdo intestinal nas aves antes do abate, estudos realizados por Hinton et al. (2000) concluíram que mesmo após 12 horas de retirada do alimento, não há redução significativa do conteúdo cecal. Devido à permanência de

conteúdo no órgão, os cecos podem continuar sendo fonte de contaminação bacteriana durante o transporte e abate das aves.

A microbiota intestinal normal representa uma barreira natural contra o estabelecimento de bactérias patogênicas (LU et al., 2003) porém, alterações na homeostase da microbiota normal podem ser induzidas por estresse, mudança na dieta, idade da ave e administração de antimicrobianos (SCHNEITZ, 1998). Com o objetivo de minimizar os efeitos negativos de um desbalanço da microbiota intestinal ou mesmo de controlar a microbiota normal, lançou-se mão de artifícios como a utilização de antibióticos em doses subterapêuticas, denominados de promotores de crescimento (DIBNER e RICHARD, 2005).

### **Uso de aditivos na alimentação animal**

Os antibióticos têm sido utilizados como promotores de crescimento na alimentação animal por mais de 50 anos (NIEWOLD, 2007). Atualmente, grande parte das integrações avícolas faz uso de antibióticos como promotores de crescimento ou moduladores da microbiota intestinal (SMITH, 2011). As bactérias presentes no trato intestinal das aves, em algumas ocasiões, podem desempenhar papel de agente patogênico para as mesmas, como por exemplo, em casos de imunossupressão ou desequilíbrio da microbiota normal (ITO et al., 2004). Embora a utilização desses compostos, em doses subterapêuticas, tenha sido um dos pontos chaves para o crescimento da avicultura mundial (DIBNER e RICHARDS, 2005), ela traz atrelada a si o problema da resistência bacteriana, a qual já era relatada por alguns autores na década de 50 (STARR e REYNOLDS, 1951; DIBNER e RICHARDS, 2005).

Em face às crescentes preocupações relacionadas ao uso de antibióticos, alguns países optaram pela imposição de restrições e limitações à utilização desses produtos na alimentação animal. A utilização dos antibióticos, seu futuro e alternativas ao uso desses têm sido discutidos por vários autores (JONES e RICKES, 2003; DIBNER e RICHARDS, 2005), os quais sugerem, entre outros, o uso de ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva como alternativas viáveis.

### **Exclusão competitiva**

O uso de microbiota competitiva é descrito por Barrow (1993) como único procedimento, baseado em princípios microbiológicos, que possui aceitação internacional por parte dos programas de controle de *Salmonella*. O fenômeno pelo qual a microbiota intestinal normal protege o seu hospedeiro da invasão de agentes patogênicos é chamado de EC ou “conceito de Nurmi” devido a esse ter realizado essa descoberta em aves (PIVNICK e NURMI, 1982).

A EC tem sido utilizada como medida profilática para aumentar a resistência das aves a infecções por bactérias do gênero *Salmonella*, principalmente. O efeito esperado da administração de produtos de EC, antes de um desafio por *Salmonella*, é impedir que a bactéria colonize os cecos, sendo eliminada gradualmente (MEAD et al., 1989). O mecanismo exato de proteção é desconhecido, mas a importância dos ácidos graxos voláteis (AGVs) tem sido reportada por vários pesquisadores (CORRIER et al., 1995; van der WIELEN et al., 2000). Culturas de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, isoladas do conteúdo do ceco de aves, foram colocadas em condições ideais de crescimento na presença de AGVs, à medida que a concentração de AGVs era aumentada, o crescimento bacteriano era reduzido (van der WIELEN et al., 2000).

Seuna (1979) e Soerjadi et al.(1981) relataram que a proteção oral contra desafio de *Salmonella* pode ser evidenciada uma ou duas hora após a administração de produto de EC. Acredita-se que, a princípio, a proteção é predominantemente física e que posteriormente há produção de AGVs e outros metabólitos benéficos.

Além de oferecer proteção contra agentes patogênicos a EC também pode influenciar positivamente os parâmetros de desempenho das aves (GOREN et al., 1984). A redução da viscosidade do conteúdo ileal, o aumento da matéria seca fecal, bem como o aumento da energia metabolizável devido à elevação na concentração de ácido propiônico, nos cecos, seriam os principais mecanismos pelo qual o desempenho pode ser influenciado pela EC (SCHNEITZ, 1998).

Os produtos de EC, normalmente, são administrados às aves logo após o nascimento, no incubatório, ou na água de bebida, logo após a chegada na granja (SCHNEITZ, 2005). Contudo, pelo tratamento ser de caráter profilático, esse deve ser administrado antes das aves serem infectadas por *Salmonella* (SEUNA, 1979), ou o mais cedo possível.

## Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos, também denominados de acidificantes, contêm uma ou mais carboxilas em sua molécula, classificação na qual podem ser incluídos os aminoácidos e os ácidos graxos. Em geral, quando o termo ácido orgânico é empregado na produção animal, refere-se aos ácidos fracos, de cadeia curta (DIBNER e BUTTIN, 2002). Alguns ácidos orgânicos, particularmente os ácidos graxos de cadeia curta, como o acético, propiônico e butírico são produzidos pelas bactérias do trato intestinal de animais e humanos, principalmente nas regiões onde a microbiota é estritamente anaeróbica (DAVIDSON, 2001).

Nos últimos 30 anos, pesquisas em torno de ácidos orgânicos de cadeia curta, principalmente os ácidos fórmico e propiônico tem demonstrado que esses compostos possuem ação antimicrobiana sobre agentes patogênicos como a *Salmonella*, a qual pode contaminar a ração pronta e matéria prima destinada a confecção da mesma (THOMPSON e HINTON, 1997).

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos, embora não totalmente elucidada, está relacionada à redução do pH e a capacidade de penetração na célula microbiana, pois quando estão na forma não dissociada são lipofílicos e podem difundir-se livremente através da membrana da bactéria, dissociando-se no seu interior, uma vez que o pH é próximo do neutro, liberando íons e prótons que alteram o pH intracelular e o gradiente de concentração iônica, causando a morte da célula pela desnaturação proteica e de DNA (CHERRINGTON et al., 1991).

O uso de ácidos orgânicos pode levar a redução do número de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no trato intestinal. Segundo Van Immerseel et al. (2006), esses compostos agem eficazmente contra *Salmonella* spp., seja pela inibição do seu crescimento por meio de mudanças no pH do meio ou pela inibição da expressão genética de alguns fatores de virulência desta bactéria.

A ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos também interfere na integridade intestinal, pois a presença de microrganismos patogênicos no trato digestivo eleva a competição por nutrientes, acelera a passagem do alimento, aumenta a descamação de células intestinais e estimula a secreção de mucina pelas células caliciformes (APAJLAHTI, 2005). Portanto, a ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos pode ser relevante para a mucosa intestinal favorecendo a estrutura e crescimento das vilosidades intestinais. Viola e Vieira (2007) comprovaram que uma mistura dos ácidos orgânicos

lático, fórmico, cítrico, acético e benzóico aumentou significativamente a altura das vilosidades e reduziu o peso do intestino de frangos de corte, devido à redução significativa da profundidade da cripta comparado ao controle negativo.

A eficácia dos ácidos orgânicos pode ser altamente influenciada por fatores extrínsecos, relacionados com o ambiente no qual eles são adicionados. Inconsistente ação antimicrobiana do ácido propiônico sobre fungos, em alimentos, tem sido atribuída à possível tamponamento e conversão à sua forma menos ativa por ingredientes proteicos, como farelo de soja (DIXON e HAMILTON, 1981).

A composição do meio também pode influenciar a sensibilidade do organismo. Por exemplo, parece haver interação entre a atividade de água e a sobrevivência de *Salmonella* spp., sendo que bactérias adaptadas a ambientes com baixa atividade de água demonstram ser mais resistentes à ação dos ácidos orgânicos (ROUSE et al., 1988). O *status* fisiológico dos agentes patogênicos também pode influenciar a eficácia dos ácidos orgânicos, bactérias na fase estacionária de crescimento parecem ser mais resistentes aos ácidos (KOLTER et al., 1993). O pH do trato intestinal pode influenciar o nível de ácidos orgânicos na forma não dissociada. Nesse ponto, também há a ação da composição da dieta, já que a dieta de aves tem alto poder tamponante (DIBNER e BUTTIN, 2002).

Existem poucas pesquisas sobre a utilização de ácidos orgânicos e produtos de EC em perus de corte. Na produção intensiva de perus existem muitas dificuldades para manter os índices de produção, principalmente nas primeiras semanas de vida. Um peru de corte macho deve obter peso final de, aproximadamente, 21,0kg, em 120 dias, o que significa que o peru de um dia de idade multiplica seu peso inicial em até 315 vezes (SCHNETTLER, 2005). Manter estes índices de produtividade tendo como resultado final um produto de qualidade e seguro ao consumidor são os maiores desafios da cadeia de produção. Nesse sentido, a utilização dos antibióticos como promotores de crescimento foi e continua sendo de grande valia, pois estes compostos auxiliam na manutenção dos índices produtivos.

Além das decisões tomadas por várias entidades governamentais e os avisos da comunidade científica sobre os riscos do uso antibióticos em larga escala, surge também um novo padrão de consumidor, mais informado e crítico em relação aos alimentos. Atualmente é cada vez maior o número de consumidores de gêneros alimentícios orgânicos ou biodinâmicos. Outra questão importante é a redução da contaminação por

*Salmonella* spp. nas aves e, conseqüentemente, no produto final. Nesse sentido, a utilização de ácidos orgânicos e produtos de EC podem ser opções viáveis e eficazes.

### **PROPOSTA DO ESTUDO**

O crescente apelo da maioria dos mercados consumidores ao aperfeiçoamento dos critérios de utilização dos antibióticos ou até mesmo a extinção do uso na produção de aves está expondo, novamente, antigos problemas, tidos como equacionados. A saúde intestinal, atualmente, é objeto de estudo e total atenção. As linhagens atuais possuem extraordinária capacidade genética para desempenho, mas podem ter todo seu potencial desperdiçado ou seriamente afetado se as funções intestinais não estiverem íntegras.

Além da tendência mundial à substituição dos fármacos na alimentação animal, o problema da resistência bacteriana aos antibióticos torna emergente a necessidade de pesquisas a cerca de produtos cujo mecanismo de ação é capaz de produzir efeitos positivos, semelhantes aos obtidos com o uso dos antibióticos na dieta animal.

Diante disso, foi realizado um experimento, apresentado no capítulo 2, denominado **Uso de ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva como alternativa ao antibiótico como promotor de crescimento na criação de perus de corte**. Esse manuscrito foi redigido de acordo com as normas editoriais da revista *Poultry Science* (ISSN 0032-5791) e teve como objetivo avaliar o uso de ácidos orgânicos e produto de EC como alternativa ao uso de antibiótico como promotor de crescimento.

O capítulo 3, denominado **Controle de *Salmonella* Enteritidis em perus de corte por meio de ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva** Esse manuscrito foi redigido de acordo com as normas editoriais da revista *Veterinary Microbiology* (ISSN: 0378-1135). O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de ácidos orgânicos e produto de EC continuamente na ração ou temporariamente na água de bebida frente ao desafio de SE.

O capítulo 4, denominado **Discussão Geral**, apresenta uma abordagem ampla dos capítulos anteriores.



## **CAPÍTULO 2**

**USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTO DE EXCLUSÃO COMPETITIVA COMO ALTERNATIVA AO ANTIBIÓTICO COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO NA CRIAÇÃO DE PERUS DE CORTE.**

## **Uso de Ácidos Orgânicos e produto de exclusão competitiva como alternativa ao antibiótico como promotor de crescimento na criação de perus de corte**

E. L. Milbradt<sup>\*1</sup>, A. S. Okamoto\*, J. C. Z. Rodrigues\*, E. A. Garcia<sup>§</sup>, C. Sanfelice<sup>§</sup>, L. P. Centenaro<sup>§</sup>, M. Copolla\*, R. L. Andreatti Filho\*

\*Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>§</sup>Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

1 Autor correspondente: [emilbradt@gmail.com](mailto:emilbradt@gmail.com)

Universidade Estadual Paulista- UNESP

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ

Hospital Veterinário s/n

Departamento de Clínica Veterinária

Laboratório de Ornitopatologia

Distrito de Rubião Junior, Botucatu - São Paulo, Brasil

CEP: 18618-970, Caixa Postal- 560

Agencia financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2011/05772-2 e 2010/20655-3)

**SEÇÃO CIENTÍFICA: PRODUCTION, MODELING, AND EDUCATION**

## RESUMO

Com objetivo de avaliar o uso de ácidos orgânicos (AOs) e produto de exclusão competitiva (EC) como alternativa ao uso de antibiótico como promotor de crescimento, foram alojados 420 perus de corte, fêmeas de 1 dia de idade da linhagem British United Turkeys (B.U.T. Big 9). As aves foram distribuídas em quatro tratamentos: **Grupo 1** (controle): dieta basal sem promotor de crescimento, **Grupo 2**: dieta basal acrescida de lincomicina 44% (4,4g/ton de ração); **Grupo 3**: dieta basal acrescida de AOs (2kg/ton de ração) e **Grupo 4**: dieta basal acrescida de produto de EC ( $10^9$  UFC/kg de ração). No 7º, 28º e 70º dia, foi avaliado o efeito dos tratamentos sobre o peso, ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração, viabilidade e altura das vilosidades intestinais. Aos 14, 28, 42, 56 e 70 dias, foi realizada a mensuração de ácidos graxos voláteis no conteúdo cecal. Na primeira semana de vida, os AOs influenciaram negativamente os parâmetros de desempenho. Na fase de engorda, o consumo de ração e conversão alimentar do grupo que recebeu AOs foi inferior ao dos demais grupos. As aves que receberam AOs e produto de EC apresentaram concentrações mais elevadas de ácido propiônico, aos 14 dias, e ácido butírico aos 28, 56 e 70 dias de vida. Os resultados obtidos com o uso do produto de EC e AOs são muito semelhantes aos obtidos com o uso do antibiótico, indicando, dessa forma, alternativas viáveis e seguras ao uso do antibiótico como promotor de crescimento.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, lincomicina, perus

## ABSTRACT

With the objective of evaluating the use of organic acids (OAs) and competitive exclusion product (CE) as an alternative to antibiotic as a growth promoter, 420 commercial turkeys, one-day-old females of the lineage British United Turkeys (B.U.T. Big 9) were housed. The birds were distributed into four treatments: **Group 1** (control): basal diet without growth promoter, **Group 2**: basal diet plus lincomycin 44% (4.4g/ton of feed); **Group 3**: basal diet plus OAs (2kg/ton of feed) and **Group 4**: basal diet plus product of CE ( $10^9$  CFU/kg of feed). On days 7, 28 and 70, the effects of the treatments were evaluated on weight, weight gain, food conversion, ration consumption, viability and height of intestinal villi. At 14, 28, 42, 56 and 70 days, the volatile fatty acids were measured in cecal content. On the first postnatal day, the OAs negatively influenced the performance parameters. In the fattening phase, the ration consumption and food conversion of group that received OAs was lower than in the other groups. The birds that received OAs and CE product presented higher concentrations of propionic acid, at 14 days, and butyric acid at 28, 56 and 70 days of age. The results obtained by the use CE product and OAs are highly similar to those found by using antibiotic, thus indicating safe viable alternatives to employing antibiotic as a growth promoter.

Key words: volatile fatty acids, lincomycin, turkeys

## INTRODUÇÃO

A suplementação da dieta animal com antibióticos com a finalidade de controlar agentes patogênicos ao processo digestivo e promover melhora nos índices zootécnicos, maximizando a produção, tem sido prática comum na indústria avícola.

Há um consenso geral de que os efeitos benéficos dos antibióticos usados como promotores de crescimento se devem ao controle da microbiota intestinal do animal (Dibner e Buttin, 2002). No entanto, essa prática pode levar ao desenvolvimento de resistência por bactérias patogênicas, as quais podem ter impacto na saúde pública (Dibner e Richards, 2005). A retirada dos antibióticos promotores de crescimento da alimentação animal pode aumentar os custos de produção devido a perdas no desempenho zootécnico e aumento na incidência de doenças entéricas, como a enterite necrótica causada pelo *Clostridium perfringens* (Smith, 2011).

Estratégias para redução ou eliminação do uso de antibióticos na cadeia avícola incluem aperfeiçoamento dos programas de biossegurança, uso de vacinas, seleção genética, controle de qualidade da matéria prima utilizada na ração e uso de outros aditivos como ácidos orgânicos (AOs) e produtos de exclusão competitiva (EC) (Sun et al., 2005). Assim como os antibióticos, os AOs também podem controlar a microbiota intestinal por meio de ação bactericida e bacteriostática, dependendo do *status* fisiológico do organismo e das características físico químicas do meio externo (Ricke, 2003).

Segundo Schneitz (2005), o método mais eficaz e inofensivo para controlar a microbiota de aves é por meio da EC, pois se trata de um tratamento biológico, o qual não deixa resíduo. Além disso, estudos demonstram que produtos de EC podem afetar positivamente o desempenho zootécnico das aves (Schneitz, 1998).

A maioria das pesquisas relacionadas com o uso de AOs e produtos de EC são conduzidos em frangos de corte e, muitas vezes, os resultados são inconsistentes (Hernández et al., 2006; Gunal et al., 2006; Isabel e Santos 2009 e Houshmand et al., 2011). Esse estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação contínua de AOs e produto de EC na dieta sobre o desempenho zootécnico, altura dos vilos intestinais e concentração de ácidos graxos voláteis no conteúdo cecal de perus de corte, como alternativa ao uso de antibiótico como promotor de crescimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Aves, instalações e equipamentos*

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (n° 177/2012 CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Foram adquiridos, de um incubatório comercial, 420 perus de corte, fêmeas de um dia de idade da linhagem British United Turkeys (B.U.T. Big 9). As aves foram alojadas em boxes com área de 5 m<sup>2</sup>, com densidade populacional inicial de 21 aves/m<sup>2</sup> e final de 4,2 aves/m<sup>2</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições de 21 aves cada: **Grupo 1 - controle:** somente dieta basal; **Grupo 2:** dieta basal acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Grupo 3:** dieta basal acrescida de AOs (2kg/ton de ração); **Grupo 4:** dieta basal acrescida de produto de EC (10<sup>9</sup>UFC/kg de ração).

Os boxes foram equipados com bebedouros do tipo pendular e comedouros do tipo tubular, adequados a cada fase da criação. Para forração dos boxes foi utilizada maravalha. Para manutenção da temperatura foram utilizadas campânulas a gás, ventiladores e aspersores de água.

### *Manejo alimentar, sanitário e dietas experimentais*

Os procedimentos de alojamento, manejo alimentar e diário foram semelhantes para todas as aves, tendo como base as indicações do Manual da Linhagem B.U.T. Big 9 (2012). As aves foram vacinadas, no incubatório, contra doença de Newcastle, rinotraqueíte infecciosa dos perus e bouba aviária.

O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*. O programa alimentar foi dividido em quatro fases: inicial (1 a 21 dias), transição (22 a 35 dias), engorda (36 a 62 dias) e final I (63 a 70 dias). As dietas foram formuladas à base de milho e farelo de soja e os níveis nutricionais atenderam as exigências mínimas recomendadas pelo *National Research Council* (NRC, 1994) (Tabela 1) para a espécie.

Como antibiótico promotor de crescimento foi utilizado a lincomicina 44%, na inclusão de 4,4g de princípio ativo por tonelada (ton) de ração.

Ácidos orgânicos: produto comercial na forma de pó, contendo uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta e média, com os seguintes níveis de garantia: ácido

acético (mínimo 37,4g/kg), ácido fórmico (mínimo 73,6g/kg) e ácidos graxos vegetais (mínimo 377,1g/kg). A inclusão foi de 2kg de produto por ton de ração.

Produto de EC: produto comercial na forma líquida, composto por microbiota intestinal inespecífica de perus *Specific Pathogen Free*, com os seguintes níveis de garantia: bactérias anaeróbicas ( $10^6$ UFC/mL), bactérias do gênero *Enterococcus* ( $10^5$ UFC/mL), coliformes não patogênicos ( $10^4$ UFC/mL) e bactérias produtoras de ácido láctico ( $10^6$ UFC/mL). Para inclusão na ração, o produto foi diluído em água destilada (1:10) e incorporado por aspersão, após o processo de peletização, na dosagem de  $10^9$ UFC/kg de ração.

Para substituição dos ácidos orgânicos nas demais dietas foi utilizado farelo de casca de arroz (inerte). Não foi utilizada droga anticoccidiana nas dietas.

### ***Variáveis analisadas***

#### ***Desempenho***

Aos sete, 28 e 70 dias, foram avaliados o peso médio, ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração e viabilidade. Para obtenção do peso médio, as aves foram pesadas em grupos, dividindo-se o peso total obtido pelo número de aves pesadas. O consumo de ração foi obtido pela diferença entre a quantidade de ração fornecida em cada fase e a sobra no momento da pesagem. Para o cálculo do consumo médio de ração e conversão alimentar ajustados pela mortalidade foram considerados a data da mortalidade e o peso das aves, conforme preconizado por Sakomura e Rostagno (2007).

#### ***Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs)***

Aos 14, 28, 42, 56 e 70 dias de vida das aves, foram retiradas, aleatoriamente, 10 aves por tratamento, as quais foram eutanasiadas pela administração de 2mg/kg de xilazina via intramuscular (*Pectoralis major*), seguido pela administração de 15mg/kg de tiopental sódico por via endovenosa. Após ser detectada a inconsciência da ave, foi realizada a administração de 3mL de cloreto de potássio (KCl) para levar o animal a óbito.

As aves foram necropsiadas, os cecos removidos para colheita de 1g de conteúdo, o qual foi diluído em 2mL de ácido fórmico (17%). Posteriormente, a mistura foi agitada e centrifugada a 1800xg. Precipitado e sobrenadante foram mantidos no mesmo tubo e armazenados a -80°C. No momento da análise, as amostras foram

centrifugadas, novamente, e 2mL do sobrenadante foram colocados em um amostrador automático (Thermo Scientific, Modelo AS3000) acoplado a um cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific, Modelo: Focus GC). A determinação dos ácidos graxos acético, propiônico e butírico foi realizada conforme preconizado por Erwin et al. (1961). Os resultados foram expressos em mM/L.

### ***Mensuração da altura dos vilos intestinais***

Do mesmo grupo de aves citado anteriormente, aos 28 e 70 dias, foi realizada a colheita das amostras para mensuração das vilosidades intestinais. Os segmentos intestinais foram divididos segundo Dyce et al. (1996): ***duodeno*** - porção entre o piloro e a parte distal da alça duodenal, ***jejuno*** - a partir da parte distal da alça duodenal até o divertículo vitelino, ***íleo*** - a partir do divertículo vitelino até a inserção dos cecos e os ***cecos*** - da inserção até suas extremidades.

Para a avaliação da altura dos vilos intestinais foram retirados fragmentos de aproximadamente dois centímetros da porção média dos segmentos. Os fragmentos foram imersos em solução de formalina 10%. A desidratação dos tecidos foi seguida pela diafanização com duas passagens por xilol e embebição em parafina plástica. A microtomia foi realizada com auxílio de micrótomo automático (Leica, RM-2145, Leica Microsystems) obtendo-se cortes de 4µm em sequência semi seriada de um corte de 30µm de descarte. As secções histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), de acordo com a metodologia preconizada por Behmer et al. (1976). As medidas de altura dos vilos foram obtidas através das análises das imagens dos cortes histológicos realizadas com auxílio de um sistema computadorizado de captura de imagem (Leica, Qwin Lite 3.0, Leica Microsystems). Foi realizada a medida da altura de 15 vilos de cada segmento colhido.

### ***Análise estatística***

Os resultados de desempenho e altura dos vilos intestinais foram submetidos a técnica de análise de variância complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (0,05%). Para a análise da concentração de AGVs foi utilizada a técnica de análise de variância não paramétrica complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (0,05%) (Zar, 2009).



## RESULTADOS

### *Desempenho*

Aos sete dias de vida, a dieta acrescida de AOs exerceu efeito negativo sobre o peso corporal e ganho de peso das aves em relação às aves que receberam somente dieta basal (Tabela 2). Aos 28 dias, final da fase de crescimento, nenhum efeito das dietas foi observado sobre os parâmetros avaliados. Na fase de engorda (28 aos 70 dias), o grupo que recebeu AOs apresentou menor consumo de ração, porém o peso, ganho de peso e conversão alimentar foram semelhantes ao das aves que receberam dieta basal e dieta acrescida de antibiótico. Ao longo de todo o período experimental (0 aos 70 dias), somente o consumo de ração foi influenciado pelas dietas. As aves que receberam AOs apresentaram menor consumo de ração, quando comparado às aves que receberam produto de EC e antibiótico.

### *Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis no conteúdo cecal*

Não houve diferença na concentração de ácido acético entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 3). Todos os grupos apresentaram elevação ( $P=0,042$ ) na concentração de AGVs entre o 14° e 28° dia, com posterior redução ( $P=0,034$ ), no 70° dia. As aves que receberam AOs (2,83mM/L) e produto de EC (2,32mM/L) apresentaram concentração mais elevada de ácido propiônico no 14° dia de vida, quando comparado ao grupo que recebeu antibiótico (1,80mM/L) e grupo controle (1,26mM/L). No 28°, 56° e 70° dia, as dietas contendo AOs e produto EC influenciaram positivamente a concentração ácido butírico do conteúdo cecal, elevando a concentração do mesmo.

### *Mensuração da altura dos vilos intestinais*

Os aditivos não influenciaram a altura dos vilos intestinais nos momentos avaliados (Tabela 4).

## DISCUSSÃO

As aves apresentaram excelente desenvolvimento corporal, obtendo resultados superiores aos preconizados pelo Manual da Linhagem B.U.T. Big 9 (2012). Na primeira semana de vida, o grupo que recebeu AOs apresentou redução no consumo de ração e menor peso corporal em relação aos demais grupos. Menor consumo de ração foi o único efeito das dietas sobre o desempenho, no final do período experimental.

Fatores como a taxa de inclusão e tipo de ácidos orgânicos podem estar relacionados à redução do consumo de ração e, segundo Cave (1984), dietas acrescidas de ácido propiônico (200g/kg ração) podem causar redução no consumo do alimento, principalmente devido à influência sobre a palatabilidade. Pouco se sabe sobre a utilização de *blend* de ácidos orgânicos na dieta de perus de corte como promotores de crescimento. Porém, de modo geral, os resultados obtidos nesse estudo se assemelham aos resultados obtidos com frangos de corte (Garcia et al., 2007).

Hernandez et al. (2006) não obtiveram efeitos positivos sobre o desempenho de frangos de corte adicionando ácido fórmico e propiônico (5.000 ou 10.000 ppm/ton ração) e Houshmand et al. (2011) não encontraram efeitos positivos no desempenho de frangos de corte com o uso de *blend* de ácidos orgânicos na inclusão de 1,5kg por tonelada de ração.

A falta de efeitos positivos dos AOs sobre o desempenho pode ser atribuída a vários fatores, sendo que o mais importante deles é a capacidade tamponante dos ingredientes presentes na dieta de aves. Além disso, tipo e concentração de ácidos utilizados, composição da dieta e condições experimentais também podem afetar a resposta das aves aos ácidos orgânicos da dieta (Dibner e Buttin, 2002).

Segundo Schneitz (2005) a EC pode melhorar o desempenho e diminuir a mortalidade das aves. Nesse estudo, o produto de EC foi adicionado à ração, semelhante ao conceito de “*direct-fed microbial*” (Elam et al., 2003). Concordando com achados de Owings (1992), não foi observado efeito positivo do produto de EC sobre o desempenho das aves, contudo, vários autores relatam efeitos positivos desencadeados com o uso de microbiota viva na ração (Grimes et al., 2008 e Angel et al., 2005). Entre os fatores que podem afetar a eficácia dos produtos de EC estão o uso de antibióticos, elevado estresse, jejum alimentar e presença de doenças antes da aplicação do produto.

Nesse estudo, não foi incluído nenhum produto com ação antimicrobiana na dieta dos diferentes grupos experimentais e, além disso, as aves foram criadas sob

condições adequadas de manejo, ambiência e lotação. Essa situação fez com que as aves se desenvolvessem em um ambiente com baixo nível de estresse e desafio patogênico. Segundo Baurhoo et al. (2007) sob condições adequadas de manejo e nutrição as aves não necessitam de aditivos para apresentar bons índices de desempenho.

Vários fatores podem interferir na resposta das aves aos aditivos, dentre eles as práticas de manejo, as condições ambientais, tipo e dosagem do aditivo e as características particulares da espécie em questão (Yang et al., 2009). Os efeitos benéficos de aditivos como antibiótico, produto de EC e ácidos orgânicos tornam-se mais evidentes quando as condições de criação das aves não são ideais. Alto desafio de patógenos e condições estressantes como alta lotação, manejo inadequado e estresse térmico podem ser encontrados em boa parte das criações comerciais de aves do tipo corte.

Os AGVs são produzidos e utilizados pelo animal como fonte de energia, porém seu significado nutricional é limitado, devido a pequena quantidade, a qual é menor do que 0,5% do peso corporal (Annison et al., 1968). Segundo van der Wielen et al. (2000), logo após a eclosão, não há AGVs no conteúdo cecal, mas a concentração se eleva rapidamente até 21º dia de vida. Nesse estudo, observamos que a concentração de todos os ácidos mensurados apresentou comportamento semelhante com elevação até 28º dia e posterior estabilização. O ácido acético é o AGV predominante no conteúdo cecal de frangos (Engberg et al., 2002), o que pode ser uma afirmativa válida também para perus, conforme evidenciado nesse estudo.

Não foi observado efeito do antibiótico sobre a concentração dos AGVs avaliados. Segundo Chaveerach et al. (2004), a maioria dos antibióticos não possui influência sobre a produção de AGVs.

O produto de EC influenciou positivamente as concentrações de ácido propiônico e butírico, provavelmente devido ao estabelecimento de microbiota produtora desses AGVs no ceco (Schneitz et al., 1998).

Em alguns momentos, as aves que receberam dieta com AOs apresentaram concentração mais elevada de ácido butírico e propiônico quando comparado ao grupo controle. Embora se acredite que ácidos orgânicos em forma de pó sejam rapidamente absorvidos no trato intestinal, perdendo a capacidade de alcançar os cecos (Thompson e Hinton, 1997), esses podem exercer influência sobre a microbiota intestinal, reduzindo a

população de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e privilegiando o estabelecimento de bactérias produtoras de AGVs.

Suplementação com produto de EC e ácidos orgânicos pode levar a alterações benéficas no trato intestinal como a redução do pH e aumento na altura dos vilos (Yang et al. 2009). A ação de agentes antimicrobianos pode reduzir a microbiota intestinal e, conseqüentemente, causar redução de toxinas, o que pode levar a mudanças na morfometria intestinal como o encurtamento dos vilos (Xu et al., 2003). Nesse estudo, não foi observada influencia dos aditivos sobre a altura dos vilos intestinais. Resultados semelhantes são descritos por Houshmand et al. (2011), os quais utilizaram ácidos orgânicos como promotores de crescimento, na ração de frangos de corte. Esses autores não encontraram nenhuma diferença na altura dos vilos e profundidade de cripta do duodeno, jejuno e íleo. Porém, Garcia et al. (2007) e Baurhoo et al. (2007) relataram que a suplementação com ácidos orgânicos influenciou significativamente a altura dos vilos intestinais e que isso influenciou positivamente o desempenho zootécnico das aves.

Os resultados obtidos com o uso do produto de EC e AOs são semelhantes aos obtidos com o uso do antibiótico, indicando, dessa forma, alternativas viáveis e seguras ao uso do antibiótico como promotor de crescimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angel, R., R. A. Dalloul, and J. Doerr. 2005. Performance of broiler chickens fed diets supplemented with a direct-fed microbial. *Poult. Sci.* 84:1222–1231.
- Annison, E. F., K. J. Hill e R. Kennworthy. 1968. Volatile fatty acids in the digestive tract of the fowl. *Br. J. Nutr.* 22:207-216.
- Baurhoo, B., L. Phillip, e C. A. Ruiz-Feria. 2007. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult. Sci.* 86:1070–1078.
- Behmer A. O., E. M. C Tolosa, A. G. Freitas Neto. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Eduspe, 1976, 239p.
- Cave, N. A. G. 1984. Effect of dietary propionic and lactic acids on feed intake by chicks. *Poult. Sci.* 63:131-134.
- Chaveerach, P., D. A. Keuzenkamp, L. J. A. Lipman, e F. Van Knapen. 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poult. Sci.* 83:330–334.
- Dibner, J. J., e J. D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poult. Sci.* 84:634–643.
- Dibner, J. J. e P. Buttin. 2002. Use of Organic acids as a model to study the impact of gut microbiota on nutrition and metabolism. *J. Appl. Poult. Res.* 11:453–463.
- Dyce K. M, W. O Sack e C. J. G. Wensing. 1996. Anatomia das aves. Páginas 896-899 in Tratado de anatomia veterinária. K. M. Dyce, C. J. G. Wensing, W. O. Sack. 2º ed. Editora Elsevier, São Paulo.

Elam, N. A., J. F. Gleghorn, J. D. Rivera, M. L. Galyean, P. J. Defoor, M. M. Brashears, and S. M. Younts-Dahl. 2003. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* 81:2686–2698.

Engberg, R. M., M. S. Hedemann e B. B. Jensen. 2002. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 43:569-579.

Erwin, W. S., G. J. Marco e E. M. Mery. 1961. Volatile fat acid analyses of blood an rumen fluid by gas cromatography. *J. of Dai. Sci.* 44:1768-1771.

Garcia, V., P. Catala-Gregori, F. Hernandez, M. D. Megias, e J. Madrid. 2007. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 16:555–562.

Grimes J. L, S. Rahimi, E. Oviedo, B. W. Sheldon and F. B. O Santos. 2008. Effects of a direct-fed microbial (Primalac) on turkey poult performance and susceptibility to oral challenge. *Poult. Sci.*, 87:1464–1470.

Gunal, M., G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan e O. Sulak. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *Int. J. of Poult. Sci.* 5:149-155.

Hernández, F., V. García, J. Madrid, J. Orengo, e P. Catalá. 2006. Effect of formic acid on performance, digestibility, intestinal histomorphology and plasma metabolite levels of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 47:50–56.

Houshmand, M., K. Azhar, I. Zulkifli, M. H. Bejo, e A. Kamyab. 2011. Effects of nonantibiotic feed additives on performance, nutrient retention, gut pH, and intestinal morphology of broilers fed different levels of energy. *J. Appl. Poult. Res.* 20:121–128.

Isabel, B., e Y. Santos. 2009. Effects of dietary organic acids and essential oils on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 18:472–476.

Manual da Linhagem B.U.T. Aviagen, disponível em: <http://www.aviagen.com/output.aspx?sec=3767&con=3791&siteId=3759> Acesso em 05-10-2012.

National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9<sup>th</sup> rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Owings, W. J. 1992. Nutritive effects of a direct-fed microbial preparation on growing turkey toms. *Poult. Sci.* 71:932–935.

Ricke, S. C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult. Sci.* 82:632–639.

Sakomura, N. K., e H. S. Rostagno. 2007. Planejamento de experimentos com monogástricos. Páginas: 3-40 in *Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos*. N. K Sakomura, H. S. Rostagno ed.. Jaboticabal, São Paulo.

Schneitz, C. 2005. Competitive exclusion in poultry: 30 years of research. *Food Control* 16:657–667.

Schneitz, C. 1998. Competitive exclusion of Salmonella: defined or undefined products. *Poult. Internat.* (August), 18–20.

Smith, J. A. 2011. Experiences with drug-free broiler production. *Poult. Sci.* 90:2670–2678.

Sun, X., A. McElroy, K. E. Webb Jr., A. E. Sefton, e C. Novak. 2005. Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. *Poult. Sci.* 84:1294–1302.

Thompson, J. L., e M. Hinton. 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on Salmonellas in the crop. *Br. Poult. Sci.* 38:59–65.

van der Wielen, P. W., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B. A. Urlings, e F. Van Knapen. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl. and Envir. Microb.* 71:2206-2207.

Xu, Z. R., C. H. Hu, M. S. Xia, X. A. Zhan, e M. Q. Wang. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.* 82:648–654.

Yang, Y., P. A. Iji, e M. Choct. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: A review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poult. Sci. J.* 65:97–114.

Zar. J. H. *Bioestatistical analysis*. Sed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009. 994p.



## TABELAS

Tabela 1. Composição percentual e estimada das dietas experimentais.

Ingredientes	Tipo de Ração			
	Inicial (1 a 21 d)	Transição (22 a 35 d)	Engorda (36 a 62 d)	Final (63 a 70d)
Farelo de Soja	51,15	47,69	42,42	38,71
Milho	35,91	39,77	45,76	49,66
Óleo Soja	5,77	5,80	5,49	6,25
Fosfato Bicálcico	2,85	2,59	2,17	1,63
Calcário	1,37	1,28	1,33	1,27
L-Lisina 98%	1,28	1,28	1,27	1,02
Bicarbonato de Sódio	0,60	0,56	0,53	0,50
Metionina	0,39	0,35	0,35	0,33
Adsorvente de micotoxina	0,30	0,30	0,30	0,30
Suplemento Mineral <sup>1</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15
Treonina	0,13	0,11	0,11	0,06
Suplemento Vitamínico <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,08	0,08
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Níveis Nutricionais Calculados				
	Inicial	Transição	Engorda	Final
Energia Metab. (kcal/kg)	3.000	3.050	3.100	3.200
Proteína Bruta (%)	28,00	26,00	24,00	21,00
Cálcio (%)	1,40	1,30	1,20	1,05
Fósforo Disponível (%)	0,75	0,70	0,60	0,50
Lisina (%)	1,82	1,70	1,50	1,30
Metionina Total (%)	0,73	0,68	0,63	0,57
Metionina + Cistina Total (%)	1,18	1,11	0,96	0,91
Arginina Total (%)	1,95	1,82	1,65	1,43
Treonina Total (%)	1,16	1,09	0,96	0,85

**1**-Enriquecimento mineral por kg de ração: Cu: 15 mg; Fe:65 mg; Mn: 110 mg; Zn:100 mg; I: 1,5 mg; Se: 0,3 mg. **2**-Enriquecimento vitamínico por kg de ração: Vit A 11250 UI Vit. D3: 4000 UI; Vit. E: 50 UI; Vit. K3: 4,5 mg, Biotina: 0,25mg, Tiamina B1: 4,5mg, Riboflavina B2: 8mg; Piridoxina: 7mg, Vit. B12: 0,020 mg; Niacina: 75 mg; Ácido Pantotênico: 23 mg; Ácido Fólico: 2 mg, Antioxidante: 15 mg.

Tabela 2. Média do peso corporal, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade de perus de corte tratados com lincomicina, ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva.

Item	Tratamentos <sup>1</sup>				p-value
	Controle	Lincomicina	Ácidos Org.	EC	
<b>Peso Corporal (g)</b>					
Inicial	61,7	61,2	62,0	61,4	0,782
7 dias	188,2b	183,2ab	175,4a	180,6ab	0,014
28 dias	1268,4	1283,6	1177,3	1272,9	0,246
70 dias	6771,8	6907,9	6431,7	6777,2	0,169
<b>Ganho de peso (g)</b>					
0 a 7 dias	126,5a	121,9ab	113,3b	119,2ab	0,014
0 a 28 dias	1206,6	1222,4	1115,3	1211,5	0,236
28 a 70 dias	5503,4	5624,2	5254,3	5504,3	0,203
0 a 70 dias	6710,1	6846,7	6396,7	6715,8	0,082
<b>Consumo médio de ração (g)</b>					
0 a 7 dias	150,3	148,9	133,8	140,7	0,081
0 a 28 dias	1693,6	1778,3	1732,1	1780,1	0,556
28 a 70 dias	10304,3b	10492,2b	9034,8a	10313,0b	0,001
0 a 70 dias	5998,0ab	6135,3b	5383,1a	6520,1b	0,023
<b>Conversão alimentar</b>					
0 a 7 dias	1,18	1,22	1,18	1,18	0,823
0 a 28 dias	1,43	1,45	1,56	1,48	0,239
28 a 70 dias	1,87ab	1,86ab	1,71b	1,87a	0,039
0 a 70 dias	1,64	1,66	1,64	1,67	0,75
<b>Viabilidade (%)</b>					
7 dias	99,1	100	98	99,1	1
28 dias	99,1	100	97,2	99,1	1
70 dias	98,2	99,1	98,1	97,1	1

<sup>a,b</sup> letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (P<0.05).

<sup>1</sup>**Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC (10<sup>9</sup>UFC/kg de ração).

Tabela 3: Mediana e valores mínimo e máximo da concentração dos ácidos acético, propiônico e butírico no conteúdo cecal de perus de corte.

AGV(mM/L)	Idade (dias)	Grupos Experimentais <sup>1</sup>			EC
		Controle	Lincomicina	Ácidos Org.	
<b>Acético</b>	14	9,64(4,55;16,10)a	7,42(6,40;12,90)a	7,02(3,97;27,68)a	9,37(5,97;23,39)a
	28	28,90(24,16;40,92)bc	25,16(16,25;28,40)b	32,26(29,03;35,30)c	25,30(17,10;31,51)b
	42	36,37(30,90;41,21)c	34,77(22,21;37,72)c	31,52(29,05;39,65)c	31,66(21,59;35,15)bc
	56	36,35(30,90;41,21)c	33,41(28,89;44,10)c	37,12(34,82;44,34)c	35,17(30,75;36,16)c
	70	22,31(18,11;23,64)b	23,86(18,82;27,71)b	20,58(17,06;25,02)b	24,01(17,83;24,82)b
<b>Propiônico</b>	14	1,80(1,14;4,40)aA	1,26(0,55;1,67)aA	2,83(0,89;3,58)aB	2,32(0,80;5,81)aB
	28	11,72(5,72;15,55)b	12,00(6,46;18,42)b	15,46(13,54;19,85)c	13,24(5,57;19,21)b
	42	16,66(11,56;24,38)c	15,90(11,60;21,26)c	15,05(9,35;21,60)c	14,05(4,45;20,85)b
	56	14,43(11,78;26,70)c	16,08(11,68;18,77)c	18,20(12,91;26,46)c	12,44(9,94;16,45)b
	70	10,22(8,20;11,65)b	8,80(5,71;11,85)b	9,20(5,63;10,65)b	8,11(7,07;10,04)b
<b>Butírico</b>	14	1,36(0,39;3,04)a	1,26(0,41;2,60)a	1,92(0,22;5,75)a	1,76(0,39;2,34)a
	28	7,10(3,83;9,24)bA	9,51(4,54;11,54)bAB	11,92(3,65;17,30)bB	12,31(3,90;19,1)bB
	42	7,89(5,25;11,15)bc	7,82(5,06;10,60)bc	9,57(5,57;16,73)bc	10,33(6,29;9,08)b
	56	8,68(8,16;12,12)bA	8,64(7,72;10,19)bA	10,63(6,43;16,11)bAB	12,23(6,82;15,67)BB
	70	4,93(4,27;6,06)cA	5,08(3,82;6,32)cAB	7,20(3,46;9,63)cB	8,88(4,25;10,69)bcB

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna e médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferem, significativamente, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (5%).

<sup>1</sup>**Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC (10<sup>9</sup>UFC/kg de ração).

Tabela 4. Média e erro padrão médio da altura dos vilos dos diferentes segmentos intestinais no 28° e 70° dia de vida das aves.

<b>Altura dos vilos (<math>\mu\text{m}</math>)* - 28 dias de vida</b>				
<b>Grupo<sup>1</sup></b>	<b>Duodeno</b>	<b>Jejuno</b>	<b>Íleo</b>	<b>Ceco</b>
Controle	2013,2	1158,1	884,3	245,5
Lincomicina	2152,7	1123,6	866,2	261,7
Ácidos Org.	1900,5	1056,5	781,1	278,6
EC	2120,6	1074,9	799,8	243,4
EPM	29,8	16,8	15,2	7,3
<b>Altura dos vilos (<math>\mu\text{m}</math>)* - 70 dias de vida</b>				
<b>Grupo<sup>1</sup></b>	<b>Duodeno</b>	<b>Jejuno</b>	<b>Íleo</b>	<b>Ceco</b>
Controle	2867,2	2070,1	1277,0	297,6
Lincomicina	2950,4	2124,1	1211,9	295,7
Ácidos Org.	3008,1	2151,1	1240,1	281,7
EC	3031,7	2133,7	1283,1	284,2
EPM	40,6	45,6	25,8	7,7

\*: Mensuração de 15 vilos por segmento – média de 10 aves por tratamento.

EPM: Erro padrão médio

<sup>1</sup>**Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração).

## **CAPÍTULO 3**

**CONTROLE DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM PERUS DE  
CORTE POR MEIO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTO DE  
EXCLUSÃO COMPETITIVA**

## **Controle de *Salmonella* Enteritidis em perus de corte por meio de ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva**

E. L. Milbradt<sup>\*1</sup>; A. S. Okamoto<sup>\*</sup>; J. R. Zamae<sup>\*</sup>; J. P. Araújo Júnior<sup>§</sup>; P. Mazza<sup>\*\*</sup>; C. R. Padovani<sup>‡</sup>; V. R. Carvalho<sup>§</sup>; C. Sanfelice<sup>\*</sup>; R. L. Andreatti Filho<sup>\*</sup>

1 Autor correspondente: [emilbradt@gmail.com](mailto:emilbradt@gmail.com)

Universidade Estadual Paulista- UNESP

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ

Hospital Veterinário s/n

Departamento de Clínica Veterinária

Laboratório de Ornitopatologia – Fone/Fax: 055-14-3880-2067

Distrito de Rubião Junior, Botucatu - São Paulo, Brasil

CEP: 18618-970, Caixa Postal- 560

<sup>\*</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>§</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências (IB), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>\*\*</sup>Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

<sup>‡</sup>Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

## RESUMO

A salmonelose é uma das mais importantes zoonoses veiculadas por alimentos e os produtos de origem avícola são considerados as principais fontes de contaminação para o homem. Esse experimento objetivou avaliar a influência dos ácidos orgânicos e produto de EC, administrados continuamente na ração e temporariamente na água, sobre a produção de ácidos graxos voláteis no ceco, população de bactérias do gênero *Lactobacillus* e da família *Enterobacteriaceae* e desafio de *Salmonella* Enteritidis (SE). A administração contínua dos ácidos orgânicos e produto de EC influenciou positivamente a quantidade de *Lactobacillus* no ingluvío e ceco, elevou a concentração de ácido butírico e reduziu a quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e a contaminação por SE no ceco. Não houve efeito da administração dos tratamentos via água de bebida sobre a concentração de ácidos graxos voláteis, população de *Lactobacillus* e contaminação de SE no ingluvío e ceco. A suplementação contínua de ácidos orgânicos e produto de EC reduziu a contaminação do ceco por SE, demonstrando serem eficaz no controle desse agente patogênico.

Palavras chave: ácidos graxos voláteis, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, qPCR

### ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most important foodborne zoonoses and products of poultry origin are considered the main sources of contamination to man. This study aimed to evaluate the influence of organic acids and CE product, administered continuously in the diet and temporarily in the water, on the production of volatile fatty acids in the cecum, the population of bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Enterobacteriaceae* and challenge of *Salmonella* Enteritidis (SE). Continuous administration of organic acids and the product of EC increased the concentration of butyric acid and reduced contamination by SE in the cecum. There was no effect of management treatments in drinking water on the concentration of volatile fatty acids, *Lactobacillus* population and contamination of SE in crop and cecum. The continuous supplementation of organic acids and the product of EC reduced the contamination by the cecum SE, proving to be effective in the control of this pathogen.

Key words: *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, qPCR, volatile fatty acids



## INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma das mais importantes zoonoses veiculadas por alimentos. *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST) são os principais sorovares associados a casos da doença em humanos (CALENGE et al., 2010).

Em 2010, a União Europeia (UE) registrou 1500 surtos de salmonelose, desses 190 foram causados por SE. Embora o número seja alto, a incidência de surtos vem diminuindo, gradativamente, nos últimos anos na UE (EFSA, 2011). O US Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2013), relata que nos Estados Unidos não houve redução nos surtos de salmonelose em humanos, nos últimos 15 anos. Isso demonstra que o controle desse agente continua sendo um desafio, principalmente para a área avícola, já que ovos, carne de perus, frangos e subprodutos destes são considerados os principais veiculadores do patógeno ao homem (EFSA, 2011).

Sabendo-se que a principal fonte de contaminação dos abatedouros são as aves que chegam contaminadas do campo, autoridades governamentais têm aplicado programas de controle do agente, os quais estão focados na prevenção e monitoramento ou erradicação da *Salmonella* dos plantéis (Brasil, 2003; EU Regulation 2160/2003; USDA-FSIS, 2006). Além desses programas, medidas de controle do agente devem ser adotadas na granja. Tradicionalmente, essas medidas tem focado programas de biosegurança, adequação de práticas de manejo, controle da qualidade da matéria prima utilizada na ração, aquisição de material genético livre de *Salmonella*, vacinação e uso de antibiótico terapêutico ou como promotor de crescimento. Porém, devido a intensa polêmica causada pelo desenvolvimento de resistência por bactérias patogênicas (Apata, 2009), as quais tem grande impacto na saúde pública, os antibióticos tem sido retirados da dieta animal e pesquisas sobre alternativas viáveis tem ganhando espaço na área da sanidade e nutrição.

Produtos de exclusão competitiva (EC) têm sido testados com o objetivo de evitar ou controlar a colonização do trato gastrointestinal de aves por salmonelas paratíficas (Schneitz, 2005). Além desses, os ácidos orgânicos (AOs), utilizados há muitas décadas na suinocultura, também têm demonstrado eficácia no controle da *Salmonella* spp., seja pela inibição do seu crescimento ou da expressão genética de alguns fatores de virulência da bactéria (Van Immerseel et al., 2004).

O objetivo desse estudo foi avaliar o uso de aditivos administrados continuamente via ração e temporariamente via água no controle da SE em perus de corte no período pré abate.

## MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (n° 177/2012 CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. A eutanásia das aves foi realizada pela administração de 2mg/kg de xilazina via intramuscular, seguido pela administração de 15mg/kg de tiopental sódico, via endovenosa. Após ser detectada a inconsciência da ave, foi realizada a administração de 3mL de cloreto de potássio (KCl) para induzir o óbito.

### *Cepa de Salmonella Enteritidis e desafio experimental*

Utilizou-se uma cepa de *Salmonella* Enteritidis (fagotipo 4) isolada de material avícola, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvida através de cultivos sucessivos em Ágar Verde Brilhante (AVB, Oxoid) contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL de meio) e rifampicina (100 µg/mL de meio), conforme Andreatti Filho et al. (1997), para facilitar posterior enumeração bacteriana.

O inóculo utilizado como desafio foi constituído de culturas da amostra de SE em BHI, incubadas a 40°C por 18 horas. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado através de diluições decimais em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões (BHI) e respectivas diluições decimais (PBS), em duplicata de AVB (Nal/Rif). A leitura das placas foi feita após incubação a 40°C por 24 horas.

Setenta e duas horas e 24 horas antes do abate, todas as aves, exceto o controle negativo, receberam a primeira e segunda dose do inóculo de SE, respectivamente, 10mL com concentração de  $3,2 \times 10^8$  UFC/mL e  $4,8 \times 10^8$  UFC/mL, o qual foi administrado oralmente, via gavagem.

### ***Aves, instalações e equipamentos***

Foram adquiridos, de um incubatório comercial, 524 perus de corte, fêmeas de um dia de idade da linhagem British United Turkeys (B.U.T. Big 9). As aves foram alojadas em boxes com área de 5 m<sup>2</sup>, com densidade populacional inicial de 21 aves/m<sup>2</sup>.

Os boxes foram equipados com bebedouros do tipo pendular e comedouros do tipo tubular, adequados a cada fase da criação. Para forração dos boxes foi utilizada maravalha. Para manutenção da temperatura, adequada a cada fase da criação, foram utilizadas campânulas a gás, ventiladores e aspersores de água.

### ***Manejo alimentar, sanitário e dietas experimentais***

Os procedimentos de alojamento, manejo alimentar e diário foram semelhantes para todas as aves, tendo como base as indicações do Manual da Linhagem B.U.T. Big 9 (2012). As aves foram vacinadas, no incubatório, contra doença de Newcastle, rinotraqueíte infecciosa dos perus e bouba aviária.

Para garantir que aves eram livres de SE, no momento do alojamento, foi realizada a colheita de mecônio e retirada de 20 aves para eutanásia e posterior pesquisa de *Salmonella* spp. por meio da metodologia preconizada por Mallinson e Snoeyenbos (1989). Semanalmente, foi realizada a colheita de cama e suabes de arrasto para a pesquisa de *Salmonella* spp.

O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*. As dietas experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja e os níveis nutricionais atenderam as exigências mínimas recomendadas pelo *National Research Council* (NRC, 1994) (Tabela 1) para a espécie.

Como antibiótico promotor de crescimento foi utilizado a lincomicina 44%, na inclusão de 4,4g de princípio ativo por tonelada (ton) de ração.

Ácidos orgânicos: produto comercial na forma de pó, contendo uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta e média. Níveis de garantia: ácido acético (mínimo 37,4g/kg), ácido fórmico (mínimo 73,6g/kg) e ácidos graxos vegetais (mínimo 377,1g/kg), inclusão de 2kg de produto por ton de ração.

Produto de EC: produto comercial na forma líquida, composto por microbiota intestinal inespecífica de perus *Specific Pathogen Free*. Níveis de garantia: bactérias anaeróbicas (10<sup>6</sup>UFC/mL), bactérias do gênero *Enterococcus* (10<sup>5</sup>UFC/mL), coliformes não patogênicos (10<sup>4</sup>UFC/mL) e bactérias produtoras de ácido láctico (10<sup>6</sup>UFC/mL).

Para inclusão na ração, o produto foi diluído em água destilada (1:10) e incorporado por aspersão, após o processo de peletização na dosagem de  $10^9$ UFC/kg de ração.

Ácidos orgânicos (água): Produto comercial específico para uso na água, contendo uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta e média. Níveis de garantia: ácido acético (mínimo 72,6g/kg), ácido fórmico e ácidos graxos vegetais (mínimo 444,0g/kg). A inclusão foi de 1,5kg de produto para 1000L de água.

Para substituição dos ácidos orgânicos nas demais dietas foi utilizado farelo de casca de arroz (inerte). Não foi utilizada droga anticoccidiana nas dietas.

### ***Delineamento experimental***

Do alojamento até o 80° dia de vida, as aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e três repetições de 24 aves cada, exceto para o grupo controle o qual foi constituído de 12 repetições de 24 aves cada, sendo: **Grupo 1- controle:** somente dieta basal; **Grupo 2:** dieta basal acrescida de lincomicina; **Grupo 3:** dieta basal acrescida de AOs; **Grupo 4:** dieta basal acrescida de produto de EC.

No 80° dia, as aves do **Grupo 1 - controle** originaram os Grupos 5, 6 e 7. Não houve mudança de box, tão pouco de densidade populacional por box. O delineamento permaneceu inteiramente casualizado com sete tratamentos e três repetições de 14 aves cada: **Grupo 1 – controle negativo:** dieta basal; **Grupo 2:** dieta basal acrescida de lincomicina; **Grupo 3:** dieta basal acrescida de AOs; **Grupo 4:** dieta basal acrescida de produto de EC; **Grupo 5:** dieta basal, administração de produto de EC, via água de bebida, durante 120 horas antes do abate; **Grupo 6:** dieta basal, administração de AOs, via água de bebida, durante 120 horas antes do abate; **Grupo 7 – controle positivo:** dieta basal.

Setenta e duas horas e 24 horas antes do abate, todas as aves, exceto o controle negativo, foram desafiadas com SE. Antes do abate, as aves foram submetidas a 12 horas de jejum alimentar e seis horas de jejum hídrico. O período de jejum foi iniciado oito horas antes da apanha e carregamento das aves.

### ***Parâmetros avaliados***

No 14°, 42°, 70° e 90° dias foram eutanasiadas 10 aves por grupo experimental para mensuração do pH e quantificação relativa de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e gênero *Lactobacillus* do conteúdo do inglúvio e ceco. Aos 90 dias também foi realizada a quantificação microbiológica de SE no conteúdo do inglúvio e ceco e mensuração da concentração dos ácidos graxos voláteis (AGVs): acético, propiônico e butírico no conteúdo cecal.

### ***Mensuração do pH do conteúdo do inglúvio e ceco***

Após a necrópsia, o inglúvio e um dos cecos, separadamente, foram colocados em placas de Petri para retirada de 1g de conteúdo, ao qual foi adicionado 1mL de água deionizada. A mistura foi agitada durante 1min para posterior introdução da sonda e leitura do pH, após a estabilização da mistura.

### ***Quantificação relativa de DNA de bactérias do gênero Lactobacillus e da família Enterobacteriaceae no inglúvio e ceco por PCR em tempo real***

A colheita das amostras foi realizada de acordo com Wise e Saragusa (2007). As cepas bacterianas utilizadas como controle positivo foram o *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) e a *Escherichia coli* (ATCC 25922).

A *Escherichia coli* foi cultivada em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) a 36°C por 12 horas. Para isolamento das colônias, 0,1mL do caldo foi estriado em placas contendo ágar MacConkey (Himedia) e mantido em estufa a 37°C por 24 horas.

O *Lactobacillus acidophilus* foi cultivado em caldo De Man Rugosa Sharpe (MRS), a 37°C, em anaerobiose, por 48 horas. Para isolamento das colônias, 0,1mL de caldo foi estriado em placa contendo ágar MRS, incubado novamente nas mesmas condições.

### ***PCR em tempo real***

O DNA bacteriano das culturas usadas como controle positivo e das amostras foi extraído com kit de extração QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante.

Para pesquisa do grupo *Lactobacillus* (incluindo gênero *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus* e *Weissella*) foi utilizado um par de primers (LacF [5'-CACCGCTACACATGGAG-3'] e LacR [5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'], Invitrogen, Brasil), amplicon com 342 pb e temperatura de anelamento de 58°C. Para pesquisa de bactérias da família *Enterobacteriaceae* foi utilizado um par de primers (EntF [5'CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC-3'] e EntR [5'-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC-3'], Invitrogen, Brasil), amplicon com 195 pb e temperatura de anelamento de 63°C (Wise e Siragusa, 2007).

A reação padrão de 20µL foi composta de 10µL de Go Taq qPCR Master Mix (Promega) 200nM de cada *primer* (Forward e Reverse), 5,02µL de água isenta de nucleases, 4µL de DNA extraído das amostras e 0,18µL de CXR Reference Dye (Promega). As reações para quantificação relativa foram executadas em placas ópticas e conduzidas em um aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems), seguindo as condições térmicas de ciclagem pré determinadas: 95°C por 2 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos; temperatura de anelamento específica de cada *primer* por 1 minuto, seguidos de curva dissociação de 95°C, 60°C com leitura de fluorescência a cada 0,1°C.

Para quantificação relativa dos grupos alvo, foram utilizadas amostras contaminadas artificialmente com as bactérias usadas como controle positivo ( $1 \times 10^4$  UFC/g de amostra). A partir dessas amostras foram construídas curvas com cinco pontos por meio de diluições sucessivas. Valores da quantificação relativa das bactérias foram obtidos usando o software SDS versão 1.2.3 (DetectionSystems Sequência 1.2.3 - 7300 Real Time PCR System - Applied Biosystems, EUA). As amostras controle de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* receberam valor relativo de 100, todos os valores foram calculados em relação a amostra controle.

### ***Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs)***

Após a remoção asséptica dos cecos, foi colhido de 1g do conteúdo, o qual foi diluído em 2mL de ácido fórmico (17%). A mistura foi agitada e centrifugada a 1800xg. Precipitado e sobrenadante foram mantidos no mesmo tubo e armazenados a -80°C. No momento da análise, as amostras foram centrifugadas, novamente, e 2mL do sobrenadante foram colocados em um amostrador automático (Thermo Scientific, Modelo AS3000) acoplado a um cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific, Modelo: Focus GC).

A determinação dos ácidos graxos acético, propiônico e butírico foi realizada conforme preconizado por Erwin et al. (1961). Os resultados foram expressos em mM/L.

### ***Quantificação de Salmonella Enteritidis no ingluvío e ceco***

O ingluvío e um dos cecos foram removidos e colocados, separadamente, em bolsas plásticas estéreis, pesados e macerados com auxílio de espátula. De acordo com o peso do órgão e conteúdo, determinou-se a quantidade de PBS a ser adicionada a fim de alcançar a proporção de 1:10, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Após a homogeneização do conteúdo, foi retirado 1mL para realizar as demais diluições até  $10^{-8}$ , em tubos de ensaio contendo 9mL PBS. Para o plaqueamento, foi utilizado 0,1mL de cada diluição em duplicata de AVB Nal/Rif, cultivadas durante 24 horas à temperatura de 40°C. Todas as amostras foram plaqueadas em duplicata. O número de UFC por grama de conteúdo e órgão foi convertido para  $\log_{10}$  para a interpretação dos resultados.

### ***Análise estatística***

Os resultados da quantificação de DNA bacteriano e pH foram submetidos à técnica de análise de variância complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (0,05%). Para análise dos resultados da mensuração da concentração de AGVs e das contagens de UFC de SE foi utilizada a técnica da análise de variância não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis) complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (0,05%) (Zar, 2009).

## **RESULTADOS**

### ***Mensuração do pH de conteúdo do ingluvío e ceco***

Os tratamentos não influenciaram os valores do pH do conteúdo do ingluvío e ceco. Os valores médios do pH do conteúdo do ingluvío e ceco foram, respectivamente, 6,18 e 6,17 para o grupo controle, 6,10 e 6,18 para o grupo tratado com antibiótico, 5,94 e 6,16 para o grupo tratado com AOs e 5,88 e 6,33 para o grupo tratado com produto de EC. Aos 90 dias também não foram evidenciadas diferenças entre os valores de pH do conteúdo do ingluvío (6,57) e ceco (7,51).

### ***Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs) do conteúdo cecal***

As concentrações do ácido acético e propiônico não foram influenciadas pelos tratamentos, porém a administração contínua de AOs e produto de EC elevou a concentração de ácido butírico no conteúdo cecal ( $P=0,041$ ) (Tabela 2).

### ***Quantificação relativa de DNA de bactérias do gênero *Lactobacillus* e da família *Enterobacteriaceae* por PCR em tempo real no inglúvio***

Todas as amostras apresentaram quantidades significativas de DNA de bactérias do gênero *Lactobacillus* e da família *Enterobacteriaceae*. Aos 14 dias de vida, houve influência positiva da dieta contendo produto de EC (40,12) sobre as bactérias do gênero *Lactobacillus*, em relação aos demais grupos (controle: 8,13; antibiótico: 9,54 e AOs: 12,34) (Figura 1). Aos 42 dias, o produto de EC continuou influenciando, positivamente, a quantidade de *Lactobacillus* (42,4) em relação aos demais grupos (controle: 12,66; antibiótico: 18,54 e AOs: 19,76). Após os 63 dias, todos os grupos apresentaram quantidades semelhantes *Lactobacillus* no inglúvio. Aos 90 dias, após os desafios de SE, nenhuma diferença foi evidenciada na quantidade de *Lactobacillus* do conteúdo do inglúvio dos diferentes grupos experimentais.

Aos 14 e 42 dias, a dieta com AOs reduziu a quantidade (0,14) de bactérias da família *Enterobacteriaceae* ( $P=0,03$ ) (Figura 2). Aos 70 e 90 dias, não houve influência dos tratamentos sobre a quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* do inglúvio.

### ***Quantificação relativa de DNA de bactérias do gênero *Lactobacillus* e da família *Enterobacteriaceae* por PCR em tempo real no ceco***

Na fase inicial, a dieta com produto de EC e dieta com AOs influenciaram, positivamente, a quantidade de *Lactobacillus* no conteúdo cecal (2,18 e 1,23, respectivamente) ( $P=0,03$ ) (Figura 3). Aos 42 dias, somente as aves que receberam dieta com produto de EC apresentaram quantidade superior de *Lactobacillus* no conteúdo cecal, em relação aos demais grupos. Aos 70 dias, os tratamentos não influenciaram a quantidade de bactérias do gênero *Lactobacillus*.

Aos 90 dias, após o desafio de SE (Figura 4), as aves dos grupos que receberam antibiótico (1,88) e AOs (1,98), continuamente, apresentaram maior quantidade de *Lactobacillus* no conteúdo cecal, quando comparado aos grupos controle positivo (1,32)



e negativo (1,45) e as aves tratadas com AOs (1,26) e produto de EC (1,37), via água de bebida.

As dietas contendo produto de EC e AOs reduziram a quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo do ceco, aos 42 e 70 dias ( $P=0,039$ ) (Figura 5). Após o desafio de SE (Figura 6), as aves que receberam AOs (0,18) e produto de EC (0,15) apresentaram menor quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, quando comparado ao grupo controle positivo (1,22) e negativo (0,45) ( $P=0,023$ ). A administração de AOs (0,42) e produto de EC (0,49), via água de bebida, reduziu a quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, quando comparado ao grupo controle positivo (1,22) ( $P=0,033$ ).

### ***Quantificação de Salmonella Enteritidis no ingluvío e cecos***

Antes da administração do desafio de SE não foi encontrada nenhuma amostra de cama ou suabe de arrasto positiva para *Salmonella* spp. A incidência de SE no ingluvío foi menor nas aves que receberam antibiótico, AOs e produto de EC continuamente na ração (Tabela 3). A administração de AOs e produto de EC via água de bebida não exerceu nenhum efeito sobre a incidência de SE, quando comparado com o grupo controle positivo. Os tratamentos administrados não reduziram a colonização do ingluvío pela SE.

A colonização por SE no ceco foi influenciada pelos tratamentos. Os grupos que receberam antibiótico, AOs e produto de EC, continuamente, apresentaram quantidades inferiores de SE, quando comparado aos demais grupos. A administração de produto de EC e AOs via água de bebida não reduziu colonização do ceco por SE, quando comparado ao grupo controle positivo.

## **DISCUSSÃO**

Os produtos de EC ou ácidos orgânicos podem ser veiculados aos animais através da ração ou água de bebida, com a finalidade de prevenir a contaminação por *Salmonella* spp. ou evitar a disseminação da contaminação ao longo da cadeia produtiva (Van Immerseel et al., 2006; Schneitz, 2005)

Nesse estudo, as aves receberam produto de EC continuamente, via ração, o que resultou em efeito positivo sobre a microbiota do ingluvío, principalmente na fase inicial, quando essas apresentaram quantidades superiores de *Lactobacillus* spp.. O

aumento na quantidade de *Lactobacillus* demonstra a viabilidade microbiológica e a eficácia do produto de EC, uma vez que um dos seus principais constituintes são as bactérias ácido lácticas. O inglúvio é o primeiro ambiente que as bactérias patogênicas irão encontrar após serem ingeridas e as condições desse local podem influenciar a sobrevivência e virulência desses microrganismos (Durant et al., 1999).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* são produtoras de ácido láctico, o qual pode reduzir o pH do órgão colonizado. Altas quantidades de *Lactobacillus* no inglúvio são desejáveis, pois previnem o estabelecimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Fuller e Brooker, 1974). Mesmo com a alta colonização do inglúvio por *Lactobacillus*, não houve redução no pH do conteúdo e na quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

A administração de produto de EC, via ração, reduziu a incidência de SE, mas não foi capaz de reduzir o número de UFC no inglúvio. A adição do produto na água de bebida não exerceu influência sobre a população de *Lactobacillus* e bactérias da família *Enterobacteriaceae*, tão pouco reduziu a incidência e o número de UFC de SE. Segundo Hume et al. (1998), quatro horas após a administração do produto de EC, as aves estariam, relativamente, protegidas contra desafios de *Salmonella* spp.. Nesse caso, devemos levar em consideração a magnitude do desafio experimental administrado.

Os cecos são locais onde ocorre fermentação, por isso concentram a maior parte das bactérias do trato gastrointestinal (Apajalahti, 2005), também são considerados um dos principais reservatórios de *Salmonella* em aves (Fanelli et al., 1971). No ceco, além do efeito positivo observado sobre as bactérias do gênero *Lactobacillus*, as aves tratadas com produto de EC apresentaram quantidade reduzida de bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Isso demonstra claramente o efeito do produto de EC sobre a microbiota, favorecendo o estabelecimento de bactérias benéficas e reduzindo a colonização do órgão por microrganismos indesejáveis, o que pode ser evidenciado após o desafio de SE. A incidência de SE foi reduzida em até 50% e o número de UFC apresentou redução de 1,8 unidades  $\log_{10}$  para o valor máximo e 3,3 unidades  $\log_{10}$  para o valor médio. A administração de produto de EC, via água de bebida, não exerceu influência sobre a microbiota do ceco, tão pouco foi capaz de reduzir a colonização por SE.

A inclusão de AOs de cadeia curta na dieta das aves, objetivando o controle e redução de contaminação por *Salmonella* spp. tem demonstrado eficiência (Hinton e

Linton, 1988; Van Immerseel et al., 2004). A atividade antimicrobiana apresentada pelos AOs é dependente do seu pKa, pH no qual ele está parcialmente dissociado, entre 3 e 5 (Dibner e Buttin, 2002). Os valores de pH do conteúdo do ingluvío e ceco, obtidos nesse estudo, são altos se forem comparados com o pH ideal de ação dos ácidos utilizados. Mesmo com pH mais elevado, existe um microambiente ácido na superfície do epitélio intestinal, o que permite a difusão dos ácidos na forma não dissociada para as bactérias e enterócitos (Engelhardt et al., 1989), facilitando a ação dos AOs sobre a microbiota intestinal, como evidenciado nesse estudo.

A administração dos AOs não exerceu efeito negativo sobre a população de *Lactobacillus*, contrariando os achados de Thompson e Hinton (1997), os quais verificaram que a administração de ácido fórmico, via ração, exerceu efeito negativo sobre a população de *Lactobacillus* do ingluvío.

A dieta acrescida de AOs reduziu a população de bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Segundo Dibner e Buttin (2002) logo após a ingestão, a atividade antimicrobiana direta dos AOs é maior, principalmente no ingluvío, devido baixa capacidade de mudança do pH da digesta, aquecimento e umedecimento da mesma. Porém, após o desafio de SE, o tratamento reduziu a incidência de SE, sem exercer efeito sobre o número de UFC no ingluvío. A microbiota do ingluvío, bem como a incidência e o número de UFC de SE não foi influenciada pela administração dos AOs na água de bebida.

Os AOs reduziram a quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo cecal das aves que receberam o produto continuamente na ração. Os ácidos orgânicos podem reduzir a microbiota total do intestino, mas são especialmente eficazes contra *E. coli* e outras bactérias ácido-intolerantes (Dibner e Buttin, 2002), dentre elas a *Salmonella* spp. e *Campylobacter*. Fato que ficou evidenciado após o desafio de SE, pois o tratamento foi capaz de reduzir 3,3 unidades  $\log_{10}$  para o valor médio e 2,8 unidades  $\log_{10}$  para o valor máximo de UFC de SE.

Segundo Van Immerseel et al. (2006), a colonização do ceco e órgãos internos pela *Salmonella* pode não ser afetada por tratamentos com ácidos orgânicos, principalmente se a pressão de infecção for alta. Os ácidos orgânicos na forma líquida e pó não chegam até o ceco, principal sítio de colonização da SE (Desmidt et al., 1997), porém, esses produtos podem, de forma indireta, elevar as concentrações de AGVs no

ceco, os quais afetam a expressão dos genes de invasão e virulência da *Salmonella* (Van Immerseel et al., 2004).

O mecanismo de ação dos antibióticos, por meio do qual melhoram o desempenho animal, ainda não está totalmente elucidado, mas há um consenso geral de que os efeitos benéficos se devam ao controle da microbiota intestinal (Barton, 2000). Segundo Angel et al. (2005), sob condições de criação favoráveis, sem qualquer doença ou estresse, torna-se mais difícil a visualização dos efeitos dos antibióticos. Nesse estudo, a dieta com antibiótico reduziu a incidência de SE no ingluvío e a incidência e o número de UFC no ceco.

A concentração mais elevada de ácido butírico no conteúdo cecal das aves tratadas, continuamente, com dieta acrescida de produto de EC e AOs, pode ser a explicação para a redução na incidência e no número de UFC de SE no ceco. Segundo Van Immerseel (2005), a colonização de SE é reduzida na presença de altas concentrações de ácido butírico. Segundo Humbolt et al. (2005), o aumento nas quantidades de bactérias ácido lácticas está correlacionado com aumento na concentração de ácido butírico, pois essas bactérias estimulam a proliferação de bactérias produtoras de ácido butírico através de mecanismo de *cross-feeding*.

## CONCLUSÃO

Os ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva demonstraram eficiência no controle da *Salmonella* Enteritidis no período pré abate somente quando administrados de forma contínua na ração, durante toda a vida da ave. A administração desses produtos, temporariamente, via água de bebida, não foi capaz de reduzir a colonização do ingluvío e ceco pela bactéria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreatti Filho R.L.; Silva, E.N.; Curi P.R. 1997. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 49,661-672.

Apata, D.F. 2009. Antibiotic resistance in poultry. Inter. J. Poult. Scie. 8(4), 404-408.

Apajalahti, J.H.A. 2005. Comparative gut micromicrobiota, metabolic challenges, and potential opportunities. J. Appl. Poult. Res. 14(2), 444-453.

Angel, R., R. Dalloul A., e Doerr J. 2005. Performance of broiler chickens fed diets supplemented with a direct-fed microbial. Poult. Sci. 84:1222–1231.

Barton, M. D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nutr. Res. Rev. 13:279–299.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003, que institui o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.

Calenge, F.; Kaiser, P.; Vignal, A. e Beaumont, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetics Selection Evolution**, v.42, p.2-11, 2010.

Desmidt, M., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F. 1997. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. Vet. Micro. 56:99-109.

Dibner, J. J. e Buttin, P. 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Micromicrobiota on Nutrition and Metabolism. J. Appl. Poult. Res. 11:453–463.

Durant, J.A., Corrier, D.E., Byrd, J.A., Stanker, L.H., and Ricke S.C. 1999. Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella enteritidis* colonization and invasion of Leghorn hens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1919–1923.

EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Updated technical specifications for harmonised reporting of food-borne outbreaks through the European Union reporting system in accordance with Directive 2003/99/EC. *EFSA Journal*, 9(4):2101, 24 pp.

Engelhardt, W., K. Ronnau, G. Rechkemmer, and T. Sakata. 1989. Absorption of short chain fatty acids and their role in the hindgut of monogastric animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23:43–53.

Erwin, W.S., Marco, G.J., Mery, E.M. 1961. Volatile fat acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dai. Scien.* 44:1768-71.

European Commission 2003. REGULATION (EC) No 2160/2003 of the European parliament and of the council of 17 November 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. *Official Journal of the European Union* L325, 1–15.

Fanelli, M.J.; Sadler, W.W.; Franti, C.E. e Brownell, J.R. 1971. Localization of *Salmonellae* within the intestinal tract of chickens. *Avian Dis.* 15:366–375.

Fuller, R., and Brooker, B.E. 1974. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. *Am. J. Clin. Nutr.* 27:1305–1312.

Hume, M. E., Corrier, D. E., Nisbet, D. J., & Deloach, J. R. 1998. Early salmonella challenge time and reduction in chick cecal colonization following treatment with a characterized competitive exclusion culture. *Journal of Food Protection*, 61, 673–676.

Hinton, M. and Linton, A.H. 1988. Control of *Salmonella* infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. *The Vet. Rec.* 123:416 -421.

Humblot, C., Bruneau, A., Sutren, M., Lhoste, E.F., Dore, J., Andrieux, C. and Rabot, S. 2005. Brussels sprouts, inulin and fermented milk alter the faecal microbiota of human microbiota-associated rats as shown by PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis using universal, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* 16S rRNA gene primers. *Brit. J. Nut.* 93:677 -684.

Mallinson, E.T.; Snoeyenbos, G.H. Salmonellosis. In: PURCHASE, H.G. et al., (Eds). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3. ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, 1989. p. 3-11.

Manual da Linhagem B.U.T. Aviagen, disponível em: <http://www.aviagen.com/output.aspx?sec=3767&con=3791&siteId=3759> Acesso em 05-10-2012.

National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.

Schneitz, C. 2005. Competitive exclusion in poultry: 30 years of research. *Food Control* 16:657–667.

Thompson, J.L. e Hinton, M. 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonella* s in the crop. *Brit. Poult. Scie.* 38:59-65.

USDA-FSIS. 2006. Serotypes profile of *Salmonella* isolates from meat and poultry products January 1998 through December 2005 No. 2007. USDA-FSIS, Washington, DC.

Van Immerseel, F., Russell, J.B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., F. Haesebrouck<sup>1</sup> and Ducatelle, R. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol.* 35(3):182-188.

Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. 2005. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of Salmonella in poultry. *Poult. Scie.* 84:1851-1856.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Bohez, L., Pasmans, F., Volf, J., Sevcik, M., Rychlik, I., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. 2004. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion shortly after infection with Salmonella Enteritidis in chickens through hilA suppression. *Appl. Env. Microbiol.* 70:3582-3587.

Wise, M.G. and Siragusa, G.R. 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community of one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J. Appl. Microbiol.* 102:1138–1149.

Zar. J. H. *Bioestatistical analysis*. Sed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009. 994p.



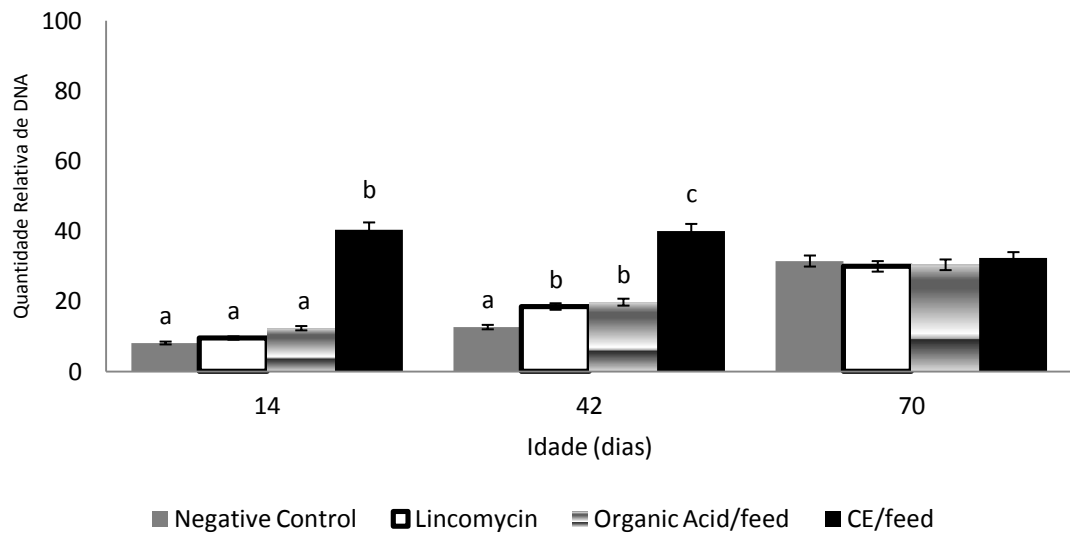
## TABELAS

Tabela 1. Composição percentual e estimada das dietas experimentais.

<b>Tipo de Ração</b>					
<b>Ingredientes</b>	<b>Inicial</b> (1 a 21 d)	<b>Transição</b> (22 a 35 d)	<b>Engorda</b> (36 a 62 d)	<b>Final</b> (63 a 70d)	
Farelo de Soja	51,15	47,69	42,42	38,71	
Milho	35,91	39,77	45,76	49,66	
Oleo Soja	5,77	5,80	5,49	6,25	
Fosfato Bicálcico	2,85	2,59	2,17	1,63	
Calcário	1,37	1,28	1,33	1,27	
L-Lisina 98%	1,28	1,28	1,27	1,02	
Bicarbonato de Sódio	0,60	0,56	0,53	0,50	
Metionina	0,39	0,35	0,35	0,33	
Adsorvente de micotoxina	0,30	0,30	0,30	0,30	
Suplemento Mineral <sup>1</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	
Treonina	0,13	0,11	0,11	0,06	
Suplemento Vitamínico <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,08	0,08	
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	
<b>Níveis Nutricionais Calculados</b>					
		<b>Inicial</b>	<b>Transição</b>	<b>Engorda</b>	<b>Final</b>
Energia Metab. (kcal/kg)		3.000	3.050	3.100	3.200
Proteína Bruta (%)		28,00	26,00	24,00	21,00
Cálcio (%)		1,40	1,30	1,20	1,05
Fósforo Disponível (%)		0,75	0,70	0,60	0,50
Lisina (%)		1,82	1,70	1,50	1,30
Metionina Total (%)		0,73	0,68	0,63	0,57
Metionina + Cistina Total (%)		1,18	1,11	0,96	0,91
Arginina Total (%)		1,95	1,82	1,65	1,43
Treonina Total (%)		1,16	1,09	0,96	0,85

1-Enriquecimento mineral por kg de ração: Cu: 15 mg; Fe:65 mg; Mn: 110 mg; Zn:100 mg; I: 1,5 mg; Se: 0,3 mg. 2-Enriquecimento vitamínico por kg de ração: Vit A 11250 UI Vit. D3: 4000 UI; Vit. E: 50 UI; Vit. K3: 4,5 mg, Biotina: 0,25mg, Tiamina B1: 4,5mg, Riboflavina B2: 8mg; Piridoxina: 7mg, Vit. B12: 0,020 mg; Niacina: 75 mg; Ácido Pantotênico: 23 mg; Ácido Fólico: 2 mg, Antioxidante: 15 mg.

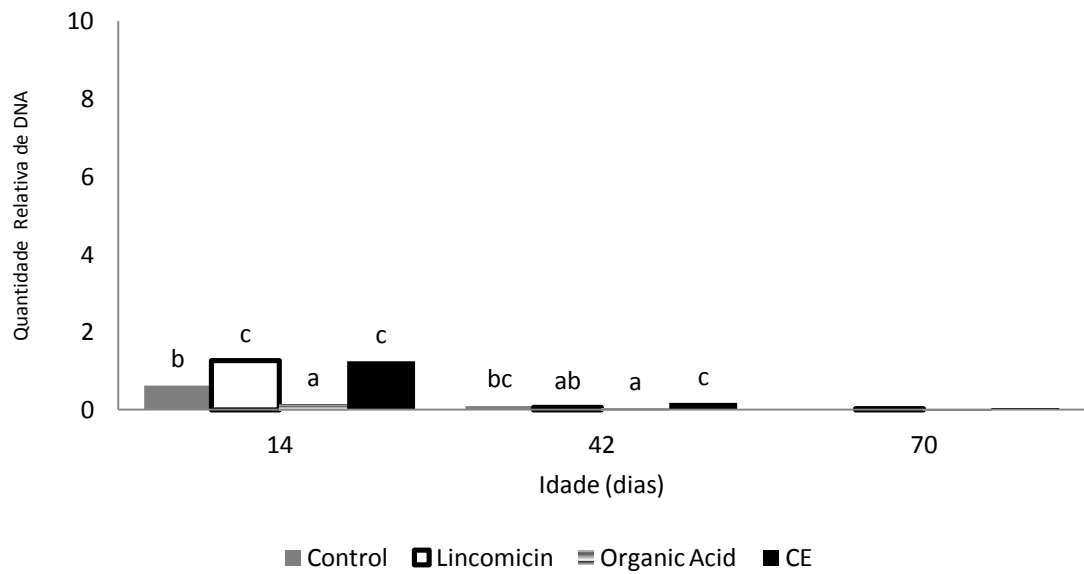
## FIGURAS



**Figura 1:** Valores de quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. no conteúdo do inglúvio de perus em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração).

As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental.

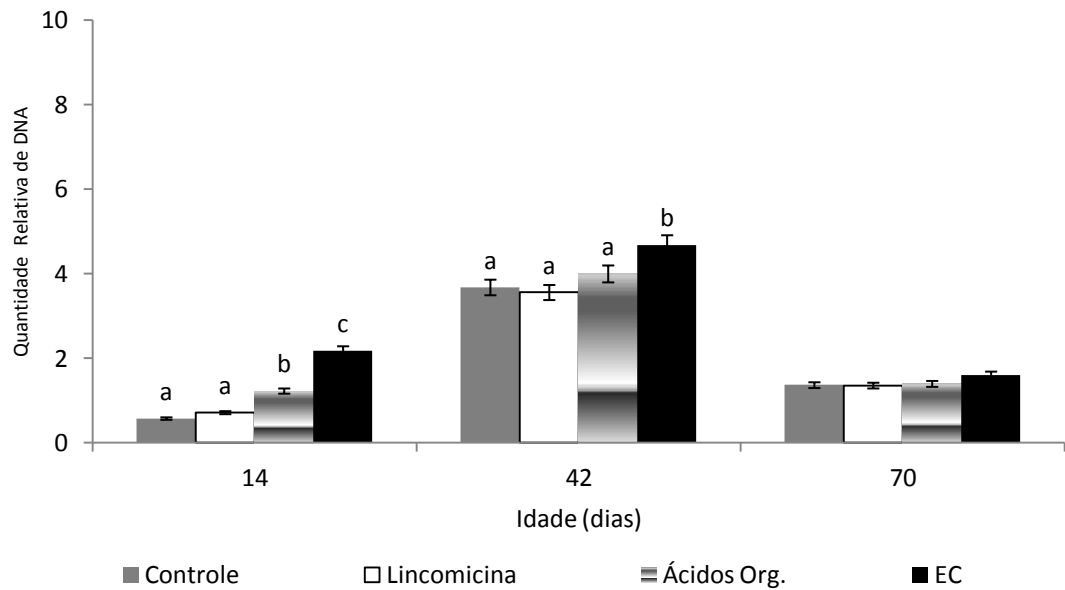
As amostras controle de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* receberam valor relativo de 100, todos os valores foram calculados em relação a amostra controle.



**Figura 2:** Valores de quantificação relativa de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo do Inglúvio em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração).

As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental.

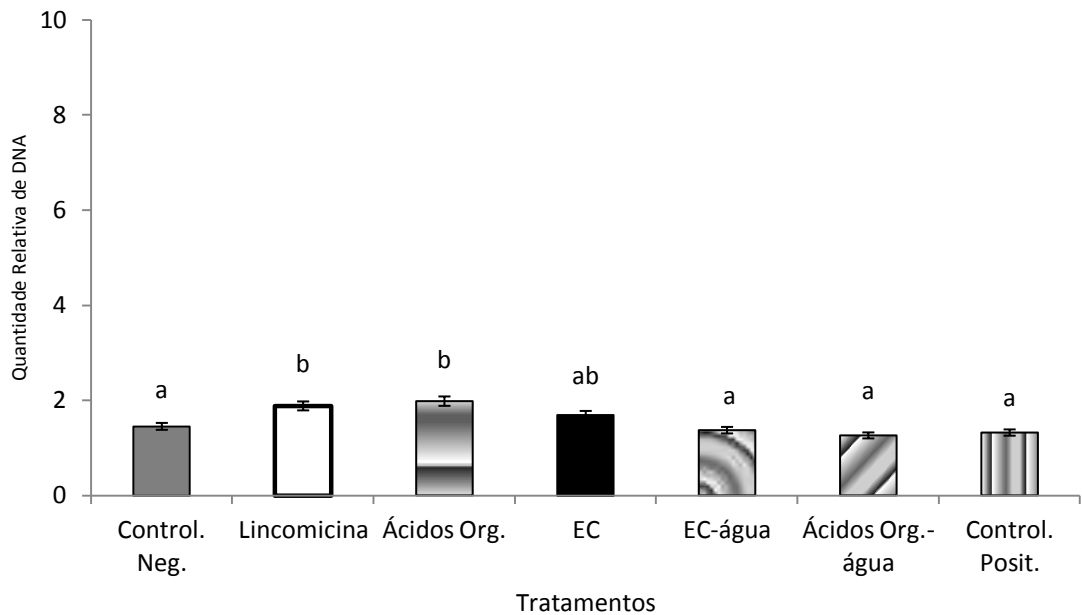
As amostras controle de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* receberam valor relativo de 100, todos os valores foram calculados em relação a amostra controle.



**Figura 3:** Valores de quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. no conteúdo do ceco de perus em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração).

As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental.

As amostras controle de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* receberam valor relativo de 100, todos os valores foram calculados em relação a amostra controle.

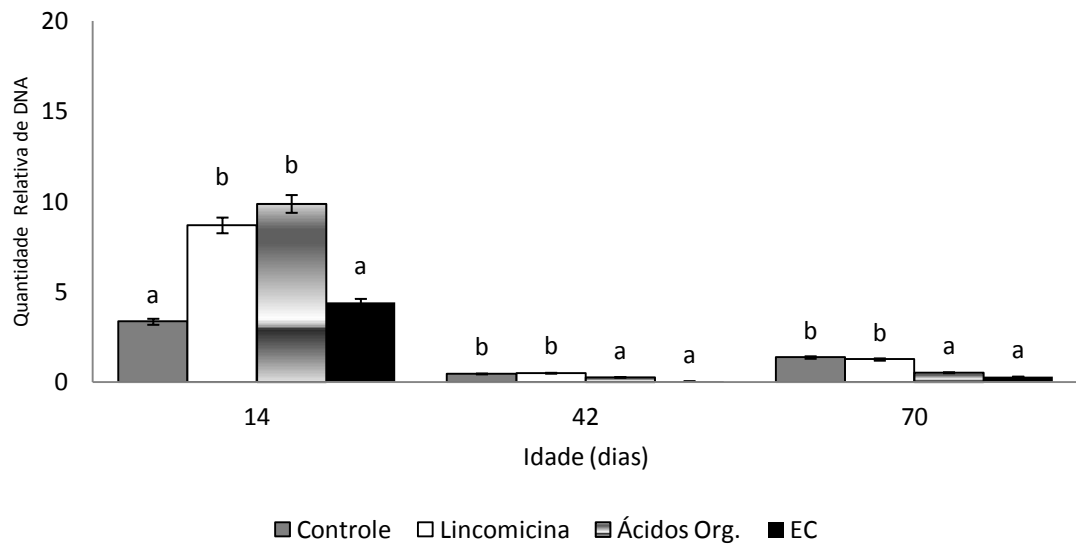


**Figura 4:** Valores de quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. no conteúdo do ceco de perus em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração); **EC-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de produto EC ( $10^9$ UFC/L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Ácido Org.-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de ácidos orgânicos (1,5 kg/1000L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Control. Pos.:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento.

As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental.

\*Exceto o Grupo Controle Negativo, os demais grupos receberam duas doses de desafio de SE.

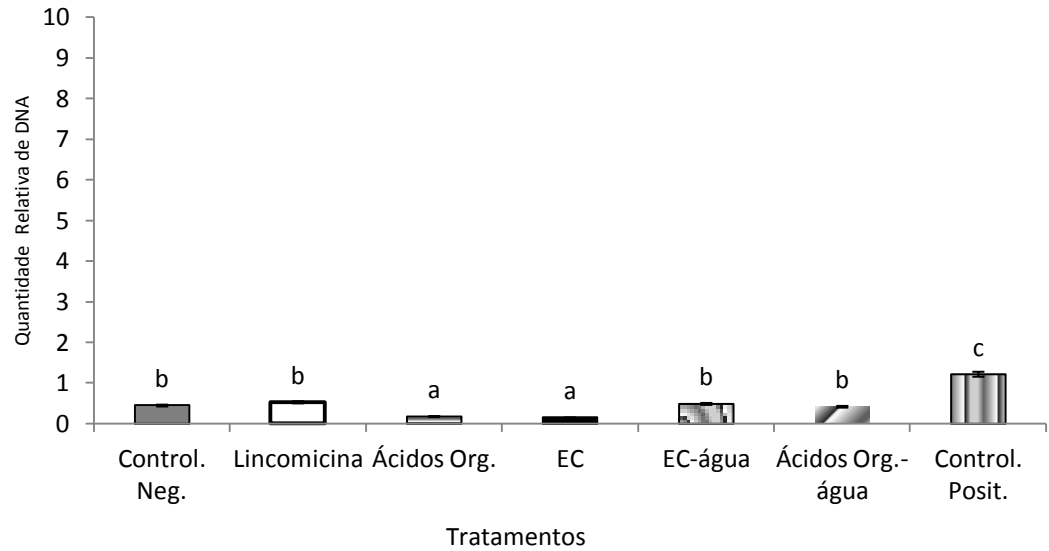
As amostras controle de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* receberam valor relativo de 100, todos os valores foram calculados em relação a amostra controle.



**Figura 5:** Valores de quantificação relativa de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo do ceco em: **Controle:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Lincomicina:** Dieta acrescida de lincomicina (4,4g/ton de ração); **Ácidos Org.:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (2kg/ton de ração); **EC:** Dieta acrescida de produto de EC ( $10^9$ UFC/kg de ração).

As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental.

As amostras controle de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* receberam valor relativo de 100, todos os valores foram calculados em relação a amostra controle.



**Figura 6:** Valores de quantificação relativa de DNA de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no conteúdo do ceco em: As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental; **CE-água:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento, administração de produto EC ( $10^9$ UFC/L) via água de bebida, 120h antes do abate; **EC-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de produto EC ( $10^9$ UFC/L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Ácido Org.-água:** Dieta sem promotor de crescimento, administração de ácidos orgânicos (1,5 kg/1000L) via água de bebida, 120h antes do abate; **Control. Pos.:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento. As avaliações foram realizadas em 10 aves por grupo experimental. \*Exceto o Grupo Controle Negativo, os demais grupos receberam duas doses de desafio de SE. As amostras controle de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* receberam valor relativo de 100, todos os valores foram calculados em relação a amostra controle.

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSSÃO GERAL**



## DISCUSSÃO GERAL

A questão do uso de antibióticos na alimentação animal vem causando polêmica há muitos anos. De um lado, consumidores, comunidade médica e uma parte da comunidade científica alegam que a indústria faz uso indiscriminado de antibióticos na alimentação animal, principalmente de princípios ativos que são utilizados na medicina humana. Além disso, que o uso desses compostos tem apenas objetivos econômicos, para aumentar os ganhos e compensar condições inadequadas de criação e que isso tem contribuído para o surgimento de patógenos resistentes a vários tipos de antibióticos. Do outro lado, a indústria rebate, dizendo que uso dos compostos é altamente controlado e que as vantagens vão além do cunho econômico, englobam o bem estar animal e muitos benefícios à saúde pública (SMITH, 2011).

Enquanto essas questões não são equacionadas, cabe-nos avaliarmos o que temos de concreto e frente a isso direcionarmos as pesquisas. Parece claro, pela atitude da União Europeia, que a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal pode ser uma realidade a ser enfrentada, em breve, por muitos outros países. Portanto, pesquisas de alternativas viáveis a esses compostos se fazem urgentes. Nesse estudo, procuramos avaliar de forma abrangente duas alternativas aos antibióticos, um composto de ácidos orgânicos e um produto de exclusão competitiva, ambos comercialmente disponíveis.

Como se pode verificar pelos resultados, os produtos não influenciaram positivamente o desempenho das aves, porém tão pouco o antibiótico apresentou ação sobre os índices pesquisados. Como mencionado anteriormente, muitos fatores podem ter influenciado o resultado, dentre eles, o fato do experimento ter sido desenvolvido em condições controladas. Para melhor elucidar a ação desses produtos sobre o desempenho das aves, seria ideal o desenvolvimento de pesquisas em condições comerciais, onde o desafio patogênico é maior e as condições de manejo nem sempre são ideais.

Ao avaliarmos a ação desses produtos sobre algumas bactérias, particularmente importantes, observamos que os mesmos desencadearam reações positivas, principalmente sobre a população de *Lactobacillus*. A elevação da concentração de ácidos graxos voláteis, produzidos por bactérias anaeróbicas, também demonstra a influencia positiva desses produtos sobre a microbiota intestinal.

Os resultados obtidos com o desafio de *Salmonella* Enteritidis, ao qual as aves foram submetidas, é um indicativo confiável da eficácia dos produtos testados. Uma vez que esses foram capazes de reduzir a colonização cecal pelo agente, mesmo frente a um desafio experimental, representado por doses altas da bactéria.

### CONCLUSÕES

Os ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva não influenciaram positivamente o desempenho das aves, porém o resultado foi semelhante ao obtido com o uso do antibiótico como promotor de crescimento, indicando que esses são alternativas viáveis ao uso do mesmo na alimentação de perus de corte.

Os ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva, administrados de forma contínua na ração, influenciaram positivamente a população de *Lactobacillus* do inglúvio e ceco e reduziram a população de bactérias da família *Enterobacteriaceae* no ceco.

A administração contínua dos ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva elevou a concentração de ácido butírico no ceco e reduziu a colonização do órgão por *Salmonella* Enteritidis.

Nas condições em que o estudo foi desenvolvido, a administração contínua de ácidos orgânicos e produto de exclusão competitiva demonstrou que esses podem ser alternativas viáveis ao uso dos antibióticos como promotores de crescimento e como forma de controle da SE, na criação de perus de corte.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.B.; MCCRACKEN, V.J.; AMINOV, R.I.; SIMPSON J.M.; MACKIE, R.I.; VESTEGEN, M.W.A.; GASKINS, H.R. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. **Pig News**, v.20, p.115–122, 1999.

APAJLAHTI, J. Comparative gut microflora, metabolic challenges and potential opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, p.444-453, 2005.

BARROW, P.A. *Salmonella* control – past, present and future. **Avian Pathology**, v.22, p.631-669, 1993.

BEAL, R.K.; POWERS, C.; WIGLEY P.; BARROW P.A.; KAISER P. e SMITH. A.L. A strong antigen-specific T-cell response is associated with age and genetically dependent resistance to avian enteric salmonellosis. **Infection and Immunity**, v.73, 7509–7516, 2005.

CALENGE, F.; KAISER, P.; VIGNAL, A. e BEAUMONT, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetics Selection Evolution**, v.42, p.2-11, 2010.

CASTANON, J.I.R. History of the use of antibiotic as growth promoters in european poultry feeds. **Poultry Science**, v.86, p.2466–2471, 2007.

CDC. 2006. Salmonella Surveillance: **Annual Summary**, 2005. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Organic acids: Chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, v.32, p.87-108, 1991.

CORRIER, D.E.; NISBET, D.J.; SCANLAN, C.M.; HOLLISTER, A.G.; CALDWELL, D. J.; THOMAS, L.A.; HARGIS, B.M.; TOMKINS, T. e DELOACH, J.R. Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce *Salmonellae* colonization. **Poultry Science**, v.74, p.1093–1101, 1995.

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P.; BEUCHAT, L.R., e MONTVILLE, T.J., *Food Microbiology—Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 2001. chap. 29, p.593–627.

DIBNER, J.J. e BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Micromicrobiota on Nutrition and Metabolism. **Journal Applied Poultry Research**, v.11, p.453–463, 2002.

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

DIXON, R.C., e HAMILTON, P.B. Effect of feed ingredients on the antifungal activity of propionic acid. **Poultry Science**, v.60, p.2407–2411, 1981.

EVANGELISTI, D.G.; ENGLISH, A.R.; GIRARD, A.E.; J LYNCH, J.E. and SOLOMONS, I.A. Influence of subtherapeutic levels of oxytetracycline on *Salmonella* Typhimurium in swine, calves, and chickens. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.8, p.664–672, 1975.

EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Updated technical specifications for harmonised reporting of food-borne outbreaks through the European Union reporting system in accordance with Directive 2003/99/EC. *EFSA Journal*, 9(4):2101, 24 pp.

FANELLI, M.J.; SADLER, W.W.; FRANTI, C.E. e BROWNELL, J.R. Localization of *Salmonellae* within the intestinal tract of chickens. **Avian Disease**, v.15, p.366–375, 1971.

FAIRCHILD, A.S.; GRIMES, J.L.; WINELAND, M.J. e JONES, F.T. Disk diffusion antimicrobial susceptibility tests against avian *Escherichia coli* isolates. **Poult. Sci.** v. 77(Supp. 1):94. (Abstr), 1998.

FOLEY S.L., LYNNE A.M., e NAYAK R. *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of Animal Science**, v.86, p149-162, 2007.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S. e GUILLOT, J.F. Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. **World's Poult. Sci. J.** v. 62, p.499–511, 2006.

GONG, J.; SI, W., FORSTER, R.J.; HUANG, R., YU, H.; YIN, Y.; YANG, C. and HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v.41, p.147–157, 2007.

GOREN, E.; DE JONG, W.A.; DOORNENBAL, P.; KOOPMAN, J.P.; KENNIS, E.H.M.. Protection of chicks against *Salmonella* infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. **The Veterinary. Quarterlay**, v.6, p.73–79, 1984.

GREKO, C. 2001. Safety aspects on non-use of antimicrobials as growth promoters. Pages 219–230 in Gut Environment of Pigs. A. Piva, K. E. Bach Knudsen and J. E. Lindberg, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

GREIN, T., O'FLANAGAN D., MCCARTHY T., e BAUER D. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium food poisoning at a wedding reception. **Ir. Medical Journal**, v.92, p.238–241, 1999.

GUSTAFSON, R.H.; e BOWEN, R.E. A review: Antibiotic use in animal agriculture. **J. Appl. Bacteriol.** v.83, p.531–541, 1997.

HAFEZ, H.M., e JODAS S. *Salmonella* infections in turkeys. In: WRAY C. e WRAY A. *Salmonella in domestic animals*. Ed. CABI international, New York, NY. 2000, p.133–150.

HINTON, A.; BUHR, R.J., e INGRAM, K.D. Physical, chemical, and microbiological changes in the crop of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. **Poultry Science**, v.79, p.212-218, 2000.

HOLT, P.S.; MITCHELL, B.W., e GAST R.K. Airborne horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in molted laying chickens. **Avian Disease**, v.42, p.45–52, 1998.

ITO, N.M.K.; MIJAYI, C.I; LIMA, E.A.; OKABAYASKI, S. Saúde gastrointestinal, manejos e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: *Produção de frangos de corte*. Campinas: Facta, 2004. cap.13, p.207-215.

JONES, F.T. e RICKE, S.C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. **Poultry Science**, v.82, p.613–617, 2003.

KOLTER, R., SIEGELE, D.A., e TORMO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. **Annual Reviews Microbiology**, v.47, p.855–874, 1993.

LU, J., IDRIS, U., HARMON, B., HOFACRE, C.L., MAURER, J.J., e LEE, M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69(11), p.6816-6824, 2003.

MEAD, G.C.; SCHNEITZ, C.E.; NUOTIO, L.O.; NURMI, E.V. Treatment of chicks using competitive exclusion to prevent transmission of *Salmonella* Enteritidis in delivery boxes. In IXTH INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION Poster Abstract, 1989, Brighton, UK. . p. 115, 1989.

- NIEWOLD, T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v.86, p.605–609, 2007.
- PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M. and LAMBAIS, M.R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. **J. Appl. Poult. Res.** v.14, p.232–237, 2005.
- PIVNICK, H. e NURMI, E. The Nurmi concept and its role in the control of *Salmonella* in poultry. In R. Davies (Ed.), *Developments in food microbiology—1*, Barking, Essex, England: Applied Science Publishers Ltd. 1982, p. 41–70.
- POPOFF, M.Y; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (n° 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research. Microbiology**, v.155, p.568-570, 2004.
- ROSTAGNO, M.H.; WESLEY, I.V.; TRAMPEL D.W. e HURD H.S. *Salmonella* prevalence in market-age turkeys on-farm and at slaughter. **Poultry Science**, v.85, p.1838–1842, 2006.
- ROUSE, J.; ROLOW, A., e NELSON, C.E. Research note: Effect of chemical treatment of poultry feed on survival of *Salmonella*. **Poultry Science**, v.67, p.1225–1228, 1988.
- SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Reviews Microbiology**, v.31, p.107–133, 1977.
- SCHNEITZ, C. Competitive exclusion in poultry: 30 years of research. **Food Control**, v.16, p.657–667, 2005.
- SCHNEITZ, C. Competitive exclusion of *Salmonella*: defined or undefined products. **Poultry International**, v.August, p.18–20, 1998.

SCHNETTLER, P. Manejo de perus comerciais. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005, SIMPÓSIO PERUS, Anais v. 2, 2005, Santos. FACTA, 2005. p. 259-268.

SEUNA, E. Sensitivity of young chickens to *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen and *S. Infantis* infection and the preventive effect of cultured intestinal microflora. **Avian Diseases**, v.23, p.392–400, 1979.

SMITH, J.A. Experiences with drug-free broiler production. **Poultry Science**, v.90, p.2670–2678, 2011.

SNEL, J., HARMSSEN H.J.M.; VAN DER WIELEN, P.W.J.J., e WILLIAMS, B.A. Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. In: BLOK, M.C.; VAHL, H.A.L.; DE LANGE, A.E; VAN DE BRAAK, G. HEMKE, e HESSING, M. *Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract*. ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. 2002. p.37–69.

SOERJADI, A.S.; STEHMAN, S.M.; SNOEYENBOS, G.H.; WEINACK, O.M., e SMYSER, C.F. Some measurements of protection against paratyphoid *Salmonella* and *Escherichia coli* by competitive exclusion in chickens. **Avian Diseases**, v.24, p.706–712, 1981.

STARR, M.P. e REYNOLDS, D.M. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. In: PROCEEDINGS OF THE 51st GENERAL MEETING, SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGY, Chicago, 1951. p.15–34.

THOMPSON, J.L. e HINTON, M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonella* s in the crop. **British Poultry Science**, v.38, p.59-65, 1997.

UBABEF, **Relatório anual 2012**. Disponível em: [http://www.abef.com.br/uba/relatorios\\_anuais.php](http://www.abef.com.br/uba/relatorios_anuais.php), acesso em maio 2013.



USDA - Progress Report on Salmonella Testing of Raw Meat and Poultry Products, 1998-2006. Food Safety and Inspection Service, USDA, Washington, DC, 2007.

USDA- 2002 Census of Agriculture. 26th ed. National Agriculture Statistics Service, USDA, Washington, DC, 2004.

van der WIELEN, P.W.; KEUZENKAMP, D.A.; LIPMAN, L.J.; VAN KNAPEN, F., and BIESTERVELD, S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. **Microbiology Ecology**, v.44, p.286–293, 2002.

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

VAN IMMERSEEL, F., RUSSELL, J.B., FLYTHE, M.D., GANTOIS, I., TIMBERMONT, L., PASMANS, F., F. HAESBROUCK1 AND DUCATELLE, R. 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.

VERSTEGEN, M.W.A.; LAN, Y.; TAMMINGA, S., and WILLIAMS, B.A. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v.61, p.95–104, 2005.

VIOLA, E.S., e VIEIRA, S.L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.1097-1104, 2007.

YAMAMOTO, R., ADLER, H.E.; SADLER, W.W. e STEWART, G.F. A study of *Salmonella* Typhimurium infection in market age turkeys. **American Journal of Veterinary Research**, v. 22, p.382–387, 1961.