

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* EM INGREDIENTES PARA
RAÇÃO DE AVES E CONTROLE DA PRESENÇA DO
AGENTE UTILIZANDO TRATAMENTO QUÍMICO**

Mariana Fröner Casagrande

Zootecnista

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* EM INGREDIENTES PARA
RAÇÃO DE AVES E CONTROLE DA PRESENÇA DO
AGENTE UTILIZANDO TRATAMENTO QUÍMICO**

Mariana Fröner Casagrande

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

Casagrande, Mariana Fröner

C334c *Clostridium perfringens* em ingredientes para ração de aves e controle da presença do agente utilizando tratamento químico / Mariana Fröner Casagrande. - - Jaboticabal, 2012
x, 39f. : il. ; 28 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Co-orientador: Antonio Carlos Paulillo

Banca examinadora: Oswaldo Durival Rossi Junior

Alessandra Aparecida Medeiros

Bibliografia

1. Avicultura. 2. Contaminação. 3. Esporos. 4. Nutrição. 5. Patógeno. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.085

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA FRÖNER CASAGRANDE - Nascida em Tanabi, SP, em 28 de setembro de 1984, filha de Rita de Cássia Fröner Casagrande e Nilton Pedro Casagrande, graduada em Zootecnia em 2010, pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. Em março de 2010 iniciou o Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) até fevereiro de 2012.

“Estou tentando aprender...

Que ter uma criança adormecida nos braços é um dos momentos mais pacíficos do mundo;

Que ser gentil é mais importante do que estar certo;

Que eu sempre posso fazer uma prece por alguém quando não tenho a força para ajudá-lo de alguma outra forma;

Que não importa quanta seriedade a vida exija de você, cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir juntos;

Que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para segurar e um coração para nos entender;
Eu aprendi...

Que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo que lhe pedimos;

Que debaixo da “casca grossa” existe uma pessoa que deseja ser apreciada, compreendida e amada;

Que Deus não fez tudo num só dia; o que me faz pensar que eu possa?

Que ignorar os fatos não os altera;

Que quando você planeja se nivelar com alguém, apenas está permitindo que essa pessoa continue a magoar você;

Que o AMOR, e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;

Que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa é me cercar de gente mais inteligente do que eu;

Que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;

Que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;

Que as oportunidades nunca são perdidas; alguém vai aproveitar as que você perdeu. Que quando o ancoradouro se torna amargo a felicidade vai aportar em outro lugar;

Que devemos sempre ter palavras doces e gentis pois amanhã talvez tenhamos que engoli-las;

Que não posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a respeito;

Que só se deve dar conselho em duas ocasiões: quando é pedido ou quando é caso de vida ou morte;

Que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer...”

(William Shakespeare)

Ofereço

Aos meus pais, Rita e Nilton, pela educação, amor, incentivo, compreensão e por me apoiarem nas minhas decisões.

Ao meu irmão, João Vitor, pela ajuda e paciência.

*"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados."*

Mahatma Gandhi

Dedico

*Aos meus avós maternos, Godofredo e Meire, e aos meus avós paternos, Modesto e Lidia
(in Memoriam), pelo exemplo de vida e pela confiança que depositam em mim.*

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,
antes que a cortina se feche e a peça termine sem
aplausos”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, por estar sempre junto a mim, me dando forças para enfrentar os obstáculos que aparecem no meu caminho.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal por oferecer os melhores professores, funcionários e conhecimentos necessários para realização do curso de Zootecnia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro.

À empresa Btech pelo auxílio financeiro que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, por todo aprendizado profissional e pelas oportunidades oferecidas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Paulilo pela ajuda indispensável.

Aos membros banca examinadora, Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior e Dra. Alessandra Aparecida Medeiros, pela atenção e sugestões.

Às pessoas do Laboratório, Mariana Massoli, Livia Boarini, Marita Vedovelli, Livia Beraldo, Clarissa Borges, Lilian Makino e a Silvina Berchielli, pela amizade conquistada e pela ajuda dispensada na realização deste trabalho.

Aos amigos de Faculdade, Xukret, Tirinha, Sorveta, Patroa, Bruna, Josephy, Gregório, Bonna, Chupeta, Todanno, Fuinha, Taliban, Seborréia, Bean, Piranha, Daniela (Jatinha), Panki e Lary, pela amizade conquistada nesses anos me ajudando a enfrentar os problemas e compartilhar os momentos inesquecíveis de minha vida e pelo ensinamento que cada uma me proporcionou com formas

diferentes e que me ajudou a amadurecer. Vocês estão guardadas no meu coração e espero estar sempre com vocês.

À Turma Zootecnia 2005, pelos grandes momentos que passamos juntos, vocês serão sempre lembrados por mim, cada um com seu jeito, cada um da sua maneira, com seus defeitos e qualidades.

Às minhas amigas, Tatiane Bula, Tatiane Leva, Michela, Inni, Patrícia e Fabiane, que perto ou longe, estão sempre presentes nos bons e maus momentos de minha vida.

Aos meus familiares pelo apoio e pelo reconhecimento de minhas conquistas.

Aos meus “filhos peludos”, Shirra, Toy, Zorro, Nicolau, Freddie, Kate, Yuri e Tom, Cherrie e Broke, pela companhia, amor e carinho dispensados a mim.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida, pois, diretamente ou indiretamente, me ajudaram a crescer e a me tornar a pessoa que sou hoje.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.	Avicultura.....	3
2.2.	Ingredientes para Ração Animal.....	3
2.3.	Contaminação dos Ingredientes de Ração.....	6
2.4.	<i>Clostridium perfringens</i>	7
2.5.	Enterite Necrótica Aviária.....	7
2.6.	Controle Microbiológico em Ingredientes de Ração.....	9
3.	OBJETIVOS.....	11
3.1.	Objetivo Geral.....	11
3.2.	Objetivos Específicos.....	11
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1.	Identificação de <i>Clostridium perfringens</i> em Farinhas.....	12
4.1.1.	Origem das Amostras.....	12
4.1.2.	Análise Microbiológica.....	12
4.2.	Inoculação Experimental de <i>Clostridium perfringens</i>	13
4.2.1.	Preparação do Inóculo de <i>Clostridium perfringens</i> para o Desafio.....	13
4.2.2.	Preparo das Amostras.....	13
4.2.3.	Dosagem de Produto a Base de Formaldeído e Ácidos Orgânicos.....	14
4.2.3.1.	Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	15
4.2.3.2.	Análise Estatística.....	15
4.2.4.	Avaliação de diferentes produtos químicos na eliminação de <i>Clostridium perfringens</i>	15
4.2.4.1.	Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> em UFC/g.....	16
4.2.4.2.	Análise Estatística.....	16
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17

5.1. <i>Clostridium perfringens</i> em Amostras <i>in natura</i>	17
5.2. Avaliação de Produto a Base de Formaldeído e Ácidos Orgânicos em Farinha de Carne e Ossos e Mistura Vegetal.....	17
5.3. Avaliação da Eficiência de Produtos Químicos em Ingredientes de Ração.....	23
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Controle Positivo da mistura vegetal e da farinha de carne e ossos que foram inoculadas experimentalmente com <i>Clostridium perfringens</i> após 24h e 5 dias, em UFC/g.....	18
Tabela 2.	População de <i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g) em Farinha de Carne e Ossos e Mistura Vegetal nos períodos de 24h e 5 dias, após a ação do produto Salmex® em dosagens pré-estabelecidas.....	20
Tabela 3.	Análise de variância para os fatores de variação do tratamento e período de ação e o efeito entre a interação tratamento versus período de ação.....	20
Tabela 4.	Comparações de médias do controle positivo e dos tratamentos com as diferentes dosagens.....	22
Tabela 5.	Contagem de colônias de <i>Clostridium perfringens</i> no Controle Positivo e nos tratamentos com Formaldeído, Ácidos Orgânicos e Salmex® nas Farinhas de Carne e Ossos, Sangue e Penas e Vísceras e Mistura Vegetal, inoculadas experimentalmente com este agente após o período de ação de 24h, em UFC/g.....	24
Tabela 6.	Contagem de colônias de <i>Clostridium perfringens</i> no Controle Positivo e nos tratamentos com Formaldeído, Ácidos Orgânicos e Salmex® nas Farinhas de Carne e Ossos, Sangue e Penas e Vísceras e Mistura Vegetal, inoculadas experimentalmente com este agente após o período de ação de 5 dias, em UFC/g.....	25
Tabela 7.	Comparações das médias em relação aos produtos, ingredientes e períodos.....	27
Tabela 8.	Comparações de médias do desdobramento da interação significativa produto <i>versus</i> período de ação.....	28

RESUMO

Com a proposta de avaliar os efeitos de produtos químicos sobre a inibição de *Clostridium perfringens* inoculado experimentalmente em ingredientes de ração, conduziu-se três experimentos. No primeiro experimento objetivou-se verificar a presença de *C. perfringens* em amostras de quatro ingredientes de ração. No segundo, o objetivo foi analisar a eficiência do Salmex[®] (uma mistura de formaldeído e ácidos orgânicos), em seis concentrações diferentes, utilizando dois ingredientes de ração em dois períodos após inoculação experimental de *C. perfringens*, já no terceiro avaliou-se o efeito de produtos à base de formaldeído e de ácidos orgânicos frente ao desafio experimental de *C. perfringens* em ingredientes de ração. Para a realização da verificação da presença de *C. perfringens* em farinha de carne/ossos, farinha de sangue/penas, farinha de vísceras e a mistura vegetal (60% de quirera de milho e 40% de farelo de soja), foi utilizado ágar DRCM incubados a 37°C por 48h em anaerobiose. Para os outros experimentos foram realizados a contagem de *C. perfringens* em dois períodos de ação, 24h e 5 dias, porém para o experimento com diferentes concentrações do Salmex[®] foram usados apenas dois ingredientes: a mistura vegetal e a farinha de carne/ossos, as concentrações desse produto variaram de 1,0g/kg a 6,0g/kg. Já para o experimento envolvendo três produtos: formaldeído, ácidos orgânicos e Salmex[®], foram utilizados quatro ingredientes: mistura vegetal, farinha de carne/ossos, farinha de sangue/penas e farinha de vísceras. Para ambas as contagens, foi usado ágar SPS a 37°C por 48h em anaerobiose. Foi isolado *C. perfringens* em 60% das amostras. O Salmex[®] diminuiu a contagem da população de *C. perfringens* nas amostras que receberam doses acima de 3g/kg, sendo mais eficiente no período de cinco dias. Houve diferenças significativas entre os produtos e o tempo de ação ($p < 0,0001$), porém não foi encontrada diferença entre os ingredientes ($p = 0,0580$). Os tratamentos com formaldeído e Salmex[®] foram mais eficientes quando comparados com os ácidos orgânicos.

Palavras-chave: avicultura, contaminação, esporos, nutrição, patógeno

ABSTRACT

This experiment had the purpose of evaluating the effects of chemicals on the inhibition of *Clostridium perfringens* in food ingredients, we conducted three experiments. In the first experiment aimed to verify the presence of *C. perfringens* in four samples of feed ingredients. In the second, the goal was to analyze the efficiency of Salmex[®] (a mixture of formaldehyde and organic acids) in six different concentrations using two feed ingredients in two periods after experimental inoculation of *C. perfringens*, since the third evaluated the effect of formaldehyde-based products and organic acids compared to the experimental challenge of *C. perfringens* in feed ingredients. To perform the verification of the presence of *C. perfringens* were used meat meal / bone meal, blood / feathers, poultry meal and vegetable mix (60% of corn grits and 40% soybean meal), was used for this DRCM agar incubated at 37°C for 48h under anaerobic conditions. For other experiments were performed to count *C. perfringens* in two periods of action, 24 hours and 5 days, but to experiment with different concentrations of Salmex[®] were used only two ingredients: the flour mixture and vegetable meat / bone, the concentrations of the product ranged from 1,0g/kg to 6,0g/kg. For the experiment involving three products: formaldehyde, organic acids and Salmex[®], we use four ingredients: vegetable mix, meat / bone meal, blood / feathers and poultry meal. On both counts, was used SPS agar at 37°C for 48h under anaerobic conditions. The Salmex[®] reduced the population counts of *C. perfringens* in samples that received doses of above 3,0g/kg, being most effective in the period of five days. There were significant differences between products and time of action ($p < 0,0001$), but no difference was found among the ingredients ($p = 0,0580$). Treatment with formaldehyde and Salmex[®] were more effective when compared with the organic acids.

Key-words: poultry, contamination, spores, nutrition, pathogen.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a avicultura é um dos setores da agroindústria mais importantes economicamente no Brasil e no mundo, principalmente pelo fornecimento de proteína de origem animal de baixo custo (FIGUEIREDO, 2001). Em 2010, o Brasil ocupou o primeiro lugar em exportação de carne de frango no âmbito mundial, contando com 3,82 milhões de toneladas, e como produtor foi o terceiro no ranking com 12,23 milhões de toneladas (ABEF, 2011). Segundo CUSTÓDIO et al. (2005) a nutrição animal é um dos pontos essenciais para se obter um elevado desempenho na pecuária. E diante da necessidade de aprimoramento, várias pesquisas, na área de nutrição, vêm sendo realizadas a fim de buscar alternativas que permitam o desenvolvimento de rações mais eficientes e econômicas para o produtor, já que este é o maior gasto durante a produção de frangos de corte (STRADA et al., 2005).

Uma alternativa para a fabricação de uma ração mais econômica é a utilização de farinhas de origem animal, já que são elaboradas a partir de resíduos de abatedouros, tais como vísceras não comestíveis, penas, sangue e gorduras, além de baratear os custos da produção de ração, tem papel importante na preservação ambiental e na reciclagem de nutrientes (NUNES et al., 2006). Esses resíduos são gerados durante o processo de abate e transformados em subprodutos nas graxarias de frigoríficos (PADILHA et al., 2005).

Segundo MAZUTTI et al. (2008), as farinhas de origem animal constituem um ambiente propício ao desenvolvimento de microrganismos, principalmente os patogênicos como *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp., durante todo o processo de fabricação e, também, no armazenamento. Um modo mais seguro de utilizar esses ingredientes é submetê-los a altas temperaturas de modo que estes microrganismos sejam destruídos (SILVA, 2009). Cabe ressaltar que o *C. perfringens* é encontrado com frequência na forma esporulada, sendo resistente aos tratamentos térmicos usuais. Este agente encontra-se largamente distribuído no meio ambiente, em grãos e no trato alimentar de animais (GOMES, 2007). PRIÓ et al. (2006) encontraram *C. perfringens*

em farelo de trigo, cevada, milho, soja e girassol. Por outro lado, em estudos de ANNETT et al. (2002) comparando a proliferação de *C. perfringens* tipo A *in vitro* em dietas a base de trigo, cevada e milho, provaram que este apresentou um menor risco de causar enterite necrótica em comparação aos outros cereais, como o trigo e a cevada. Já que, no experimento o mesmo apresentou menor crescimento deste microrganismo.

Em aves, o *C. perfringens* é o agente responsável pela doença denominada enterite necrótica que causa grandes perdas econômicas devido a diminuição na absorção de nutrientes e, com isso, ocorre um menor ganho de peso e conversão alimentar (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2009).

Por causa dessa contaminação microbiana, as indústrias de alimentos para animal vêm procurando diminuir a quantidade dessa população microbiana utilizando algumas estratégias para controle, incluindo tratamentos com produtos químicos, tais como ácidos orgânicos, formaldeído, terpenos e extratos de óleo vegetal (GONZALES, 2004; WALES et. al, 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Avicultura

A partir da metade do século XX, a avicultura brasileira passou por uma série de modernizações, principalmente nos setores de genética, manejo, nutrição, instalações e sanidade, transformando-se em uma atividade altamente produtiva (TINOCO, 2001).

Atualmente, o setor avícola brasileiro é um dos principais exportadores mundiais de carne de frango (TAVARES et al., 2007). Segundo dados de 2010 da ABEF, o Brasil é o primeiro exportador mundial com 3,819 milhões de toneladas, apresentando um aumento do consumo médio per capita/ano de carne de frango no Brasil, passando de 29,91kg, em 2000, para 44,09kg em 2010.

Uma das melhorias no quesito nutrição foi o aumento na conversão alimentar de frangos, que entre 1930 e 1996, aumentou 65% e a diminuição da quantidade de ração consumida em 50%. Outra melhoria foi na idade ao abate das aves que passou de 105 dias, em 1930, para 45 dias, em 1996 (ALVES FILHO e ARAÚJO, 1999).

Existem diversas pesquisas sendo desenvolvidas no campo da nutrição, em busca de uma ração mais eficiente e econômica, já que o gasto com alimentação eleva os custos da produção animal (STRADA, 2005).

Para que o desempenho das aves seja alto, é necessário fornecer uma dieta com ingredientes de alta qualidade desde os primeiros dias de vida das aves, principalmente porque é nesse período que a ave começa a se desenvolver (OLIVEIRA et al., 2009).

2.2. Ingredientes para Ração Animal

Os ingredientes para ração de origem animal, os quais resultam do processamento de resíduos não consumidos pelo homem, são ricos em nutrientes, sais minerais e vitaminas, sendo considerados importantes para a fabricação de ração para animais domésticos, movimentando um mercado em expansão (COSTA et al., 2008).

No Brasil, segundo dados da SINDERAÇÕES (2010), a produção na indústria de alimentação animal, em 2010, apresentou crescimento de 4% comparado a 2009,

produzindo cerca de 61 milhões de toneladas de rações, sendo que o consumo dessa ração pela avicultura de corte brasileira foi de 29 milhões de toneladas, representando o setor de maior demanda no país.

Para que os alimentos para animais sejam produzidos com qualidade e em larga escala é necessário que o controle da qualidade comece com a aquisição de boas matérias primas, ou seja, é preciso adquirir produtos com qualidade, para assim, elaborar uma ração com qualidade física, sanitária e nutricional, auxiliando desse modo na melhoria do potencial genético, da eficiência produtiva, reprodutiva e alimentar dos animais (CUSTÓDIO et al., 2005).

A transformação dos resíduos de abatedouros, como é o exemplo das farinhas de origem animal (FOA), em produtos aproveitáveis para a nutrição animal é importante tanto para ajudar a diminuir os custos da ração quanto para evitar a poluição ambiental por meio desses resíduos, reduzindo os gastos com o seu tratamento (PRICE e SCHWEIGERT, 1994). Segundo PADILHA et al. (2005), os principais resíduos de abatedouros são vísceras não comestíveis, cabeça, peles, ossos, penas, sangue, gordura e carcaças não classificadas.

O processamento das FOAs consiste em retirar a água em excesso, triturar os resíduos de abatedouros e cozinhar no digestor, com temperatura e tempo variáveis. Logo após o cozimento é feita a separação do conteúdo sólido e da parte líquida, uma mistura de água e gordura. A parte sólida é resfriada à temperatura ambiente e moída. Já a parte líquida ocorre à separação da água e da gordura, esta é novamente processada no digestor (BELLAYER, 2001; SILVA et al., 2009). O processo básico da produção de FOAs pode ser visualizado no fluxograma mostrado na Figura 1.

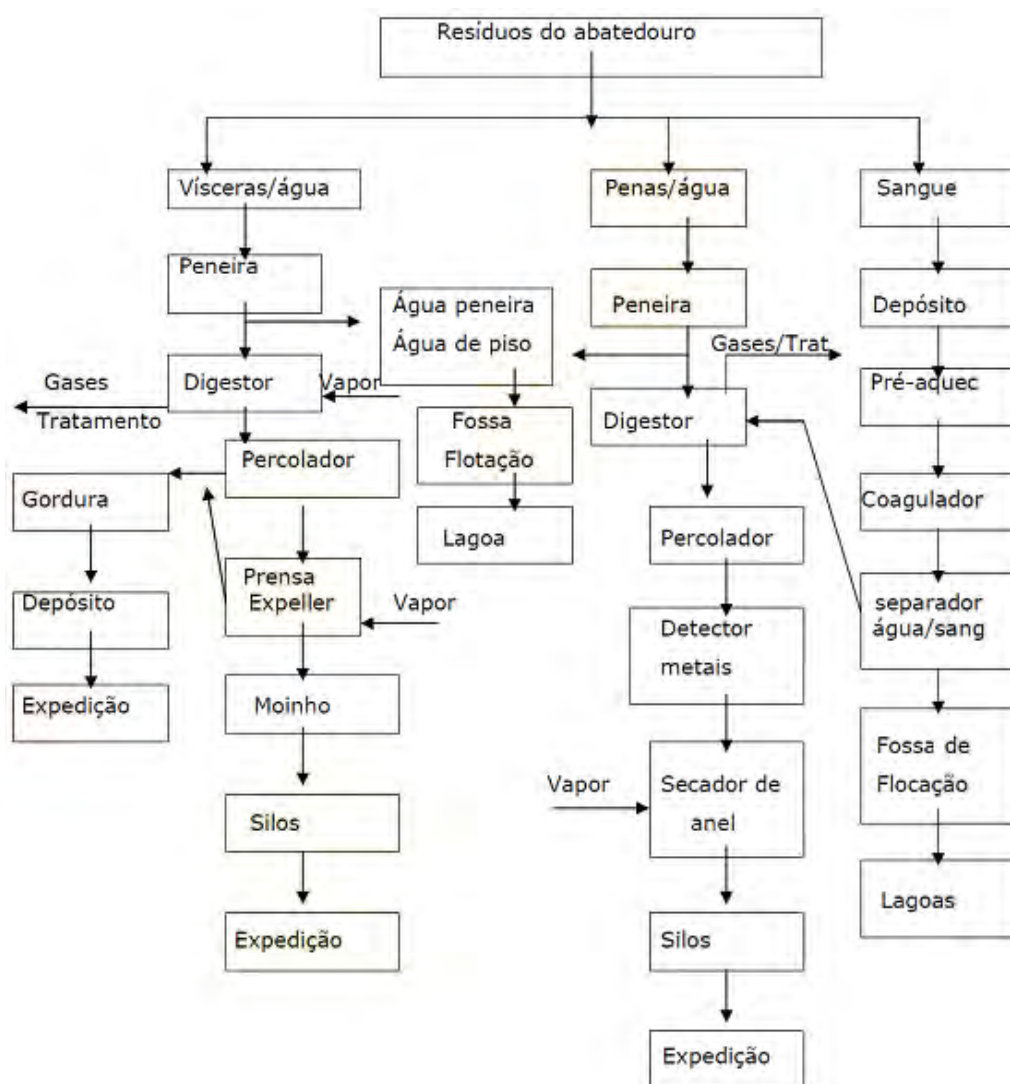


Figura 1. Fluxograma industrial de subprodutos, segundo MAFFI (1994) citado por BELLAVER (2001).

Durante o processamento das FOAs, pode haver algumas variações que alteram a qualidade final deste produto, tais como umidade, textura, contaminações com materiais estranhos e com microrganismo tanto no abate como durante o processamento (BELLAVER, 2002).

Por causa da ocorrência de doenças como a Encefalopatia Espongiforme Bovina na Europa, alguns mercados internacionais vem buscando consumir frangos que sejam

estritamente alimentados com dietas vegetarianas, tais como o milho e o farelo de soja sem a adição de FOAs. Porém o uso dessas dietas vegetarianas tem diminuído o desempenho de frangos, mesmo essas dietas tendo o mesmo nível de nutrientes de uma ração composta de ingredientes de origem animal (BELLAYER et al., 2005).

Os alimentos básicos, em todas as rações de criação, são o milho e o farelo de soja já que são ricos em energia e em aminoácidos essenciais, respectivamente (SHUTTE et al., 1990). Porém, o farelo de soja apresenta fatores anti-nutricionais, tais como a presença de oligossacarídeos (PARSONS et al., 2000).

A má qualidade dos grãos afeta diretamente o valor nutritivo do ingrediente, pois altera a composição química, diminui a biodisponibilidade dos nutrientes, presença de fatores anti-nutricionais e proliferação de microrganismos (ROSTAGNO et al., 1993).

BELLAYER (2004) relata que a qualidade das rações e dos ingredientes visa à segurança alimentar tendo em base a ausência de substâncias e microrganismos que prejudiquem a saúde dos animais, ambiente e dos seus consumidores. Esse mesmo autor ressalta que as rações têm uma relação direta com a segurança alimentar do homem e que a legislação não permite que os produtos para animais sejam maléficos à saúde dos cidadãos e, portanto devem oferecer garantia de utilização.

De acordo com MAPA (2008), para que um ingrediente de ração esteja nos padrões higiênicos sanitários, este deve apresentar, ausência de bactérias patogênicas e esporos, sendo a ausência de *Salmonella* sp. em 25 g e a ausência de *Clostridium perfringens* em 1 g de produto, após o processo de esterilização.

2.3. Contaminação dos Ingredientes de Ração

A presença de microrganismos, tais como *Salmonella* sp e *C. perfringens*, em ingredientes de rações constitui em um problema, pois podem provocar doenças tanto em animais como em humanos (SANTOS et al., 2000).

Segundo LONGO et al. (2010), diversos autores relatam a presença de *Salmonella* sp. em ingredientes de rações. Porém, de acordo com PRIÓ et al. (2006), não só a *Salmonella* sp. foi encontrada em ingredientes de ração, mas também outras

bactérias foram encontradas, como o caso da *E. coli* e do *C. perfringens*, em ingredientes tanto de origem vegetal, como milho, cevada, trigo e girassol, quanto de origem animal, como na farinha de carne e de peixe.

É bom lembrar que as farinhas de origem animal (FOAs) são um ambiente propício para a proliferação de microrganismos principalmente os patogênicos, sendo que a contaminação pode ocorrer tanto durante o processamento quanto no armazenamento (MAZUTTI et al., 2008).

Deste modo, é de suma importância realizar adequadamente o controle microbiológico tanto nas matérias-primas de ração como no produto final que será consumido pelos animais, isso ajuda na redução da contaminação (LONGO et al., 2010).

2.4. *Clostridium perfringens*

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria Gram positiva, anaeróbia e esporulada capaz de produzir toxinas tais como A, B, C, D e E (TORTORA, 2005), podendo ser encontrada no solo, em grãos e no trato gastrointestinal dos animais e do homem (GOMES, 2007).

Esta bactéria é causadora de várias doenças, tais como a gangrena gasosa e a intoxicação alimentar no homem e a enterite necrótica em aves (NILLO, 1980). De acordo com SCHOCKEN-ITURRINO et al., (2009) a enterite necrótica é causada pelo *C. perfringens* tipo A e C, causando enormes perdas econômicas na avicultura.

Alguns fatores ajudam na multiplicação deste patógeno, tais como qualidade da cama, densidade populacional e local de criação, sendo considerados fatores de risco para o desenvolvimento da enterite necrótica aviária (SANTOS et al., 2008).

2.5. Enterite Necrótica Aviária

A Enterite necrótica é uma enterotoxemia aguda, não contagiosa, encontrada principalmente em animais jovens e causada pela rápida multiplicação do *Clostridium perfringens* no intestino das aves (SANTOS et al., 2008).

Vários surtos dessa doença têm sido associados com a contaminação de *C. perfringens* em ingredientes de ração e nas camas (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2009). Há vários fatores que aumentam a incidência de enterite necrótica aviária, sendo eles fatores nutricionais, físicos, doenças intestinais e imunossupressão. Porém os fatores mais comuns para o desenvolvimento do *C. perfringens* no trato intestinal, são os danos ocasionados por patógenos coccidianos, tais como a *Eimeria* spp., já que as lesões facilitam a entrada de *C. perfringens*, fazendo-o se desenvolver com maior rapidez (VAN IMMERSEEL et al., 2004). Na figura 2, pode-se observar os principais fatores causadores da Enterite Necrótica.



Figura 2. Fatores predisponentes para enterite necrótica. Fonte: BERCHIERI JUNIOR, 2009.

Os principais sinais clínicos desta doença são sonolência, depressão, penas eriçadas, desidratação, diarreia e diminuição do apetite, podendo causar a morte, sendo que na forma aguda da enterite necrótica as taxas de mortalidade podem alcançar 50% (RIDDELL & KONG, 1992; GADZINSKI & JULIAN, 1992).

O diagnóstico pode ser feito através das lesões macroscópicas e microscópicas, pelo isolamento do *C. perfringens*, ELISA e PCR. (SANTOS et al., 2008). Já o controle e a prevenção podem ser feitos com a vacinação contra *C. perfringens*, controle das coccidioses, antibióticos promotores de crescimento, o uso de probióticos e prebióticos, e da nutrição adequada (VAN IMMERSEEL et al., 2004). Para o tratamento é utilizado antibióticos de amplo espectro, tais como, lincomicina, bacitracina de zinco, oxitetraciclinas e tartarato de tilosina (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2009).

2.6. Controle Microbiológico em Ingredientes de Ração

Para reduzir a contaminação microbiana em rações, as principais medidas são monitorar e controlar a contaminação bacteriana nos ingredientes e nas ferramentas utilizadas no processamento de fabricação dos ingredientes. O controle dos microrganismos pode ser realizado tanto com tratamento térmico durante a produção como através de tratamentos químicos aplicados em diferentes etapas da produção e da armazenagem (WALES et al, 2010).

O tratamento térmico ocorre em todas as farinhas de origem animal (FOAs), que segundo o MAPA (2008), pode ser realizado antes do processo de cocção dos subprodutos ou na própria farinha, desde que seja empregado vapor saturado direto a uma temperatura mínima de 133°C por um tempo mínimo de 20 minutos, objetivando a eliminação de possíveis patógenos. No entanto, durante o tratamento térmico pode ocorrer a degradação de proteínas e outros componentes, perdendo, assim, a qualidade nutricional do produto (MAZUTTI et al., 2008).

A partir da década de 1990, vem crescendo a preocupação com o uso excessivo de antibióticos como promotores de crescimento em aves, já que seu uso pode selecionar microrgânicos patogênicos mais resistentes ao determinado antibiótico, gerando uma dificuldade de destruir esses patógenos tanto no plantel como em humanos. Essa resistência depende do tipo de microrganismo, se é ou não esporulado (HEINZEL, 1998 citado por RICKE, 2001). Cada vez mais tem-se buscado alternativas para eliminar microrganismos sem o uso de quaisquer tipo de antibióticos. Os principais produtos utilizados para esse fim são produtos a base de ácidos orgânicos, formaldeído entre outros produtos químicos (RICKE, 2001).

O controle microbiológico em rações, também pode ser feito com a adição de produtos químicos, visando melhorar o desempenho das aves (DIBNER e BUTTIN, 2002). Esses produtos químicos que auxiliam no controle da proliferação bacteriana são os ácidos orgânicos (ácido acético, ácido propiônico e seus sais, ácido cítrico e ácido fórmico), etanol, formaldeído, álcool, acetato de zinco e propionato de zinco, porém a eficiência desses compostos sofre variação. Os aditivos bactericidas considerados bons devem ser estáveis até o momento do consumo pelo animal (LONGO et al., 2010).

Os ácidos orgânicos alteram o pH da ração, atuando como bactericida (OSTERMANN et al., 2005). Além dessa ação, os ácidos orgânicos podem manter a saúde do trato intestinal das aves, aumentando o rendimento zootécnico, sem deixar resíduos na carne (PARTANEN e MROZ, 1999).

Segundo LAMBERT & STRATFORD (1999) citado por BASSAN et al. (2008), os ácidos orgânicos ao entrarem em contato com o ácido estomacal das aves se dissociam, não conseguindo chegar até o intestino onde é necessária sua atuação, contudo há uma forma de se evitar essa dissociação antes de chegar ao intestino das aves, sendo que o procedimento é proteger esses ácidos com uma matriz que seja resistente à acidez estomacal.

Existem produtos comerciais que misturam ácidos orgânicos com outras substâncias, tais como o formaldeído. Esta combinação tem mostrado resultados satisfatórios na eliminação de microrganismos em rações para animais (ALBUQUERQUE et al., 1998; CARRISQUE-MAS et al., 2007). Porém um dos impecílios no uso de produtos a base de formaldeído é a volatilização desse produto após a aplicação na ração, já que ele se caracteriza por ser um elemento químico volátil (KHAN et al., 2003).

De acordo com LONGO et al. (2010), o controle da qualidade microbiológica em rações tem se tornado cada vez mais importante devido à segurança alimentar e ao aumento da importância da redução ou da restrição do uso antibióticos promotores de crescimento para aves.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Tendo em vista o exposto, idealizou-se o presente trabalho que teve por objetivo a avaliação de produtos químicos na inibição de *Clostridium perfringens* em ingredientes utilizados como ração para aves.

3.2. Objetivos Específicos

Demonstrar a presença de *C. perfringens* em farinhas de origem animal e vegetal;

Verificar o efeito de diferentes dosagens (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 g/kg) de uma mistura de formaldeído e ácidos orgânicos, o Salmex[®], no controle de *C. perfringens*, após o desafio experimental, em dois ingredientes destinados à fabricação de ração para aves, farinha de carne/osso e a mistura vegetal, nos períodos de 24h e cinco dias;

Avaliar a eficiência de diferentes produtos à base de formaldeído e ácidos orgânicos em dois períodos de ação (24 horas e cinco dias) após o desafio experimental de *C. perfringens* em ingredientes usados em ração para aves, como a farinha de carne/ossos, a farinha de vísceras, a farinha de sangue/penas e a mistura vegetal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Anaeróbios, do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV- UNESP, Campus de Jaboticabal, no período de Julho de 2010 a Janeiro de 2011.

4.1. Identificação de *Clostridium perfringens* em farinhas

4.1.1 Origem das amostras

Foram analisadas amostras *in natura* de farinhas de origem animal (farinha de sangue e penas, farinha de vísceras e farinha de carne e osso), e uma mistura vegetal com 40% de farelo de soja e 60% de quirera de milho, em um total de 80 amostras, sendo 20 de cada ingrediente. Os ingredientes foram coletados em frigoríficos e em fábricas de ração para frangos, nas regiões de Campinas e de Votuporanga, no interior do estado de São Paulo.

4.1.2. Análise microbiológica

Para a análise das amostras *in natura* foram pesados 25g, sendo primeiramente, diluídas em 225 mL de água peptonada a 1% (previamente esterilizadas) e feitas diluições seriadas até 10^{-6} , que posteriormente foram submetidas a choque térmico, para eliminar possíveis contaminantes. Em seguida, foram semeadas pelo método “pour plate”, em placas de Petri contendo ágar DRCM (Diferential Reinforced Clostridial Medium da Merck®) e incubadas a 37°C por 48h em anaerobiose com o sistema GasPack® (APHA, 2001).

As colônias com características morfológicas semelhantes a do *C. perfringens* foram recolhidas e coradas pelo método de Gram para observação microscópica. Após este procedimento, as colônias que se apresentaram como bastonetes Gram positivos, esporulados e catalase negativas, foram repicadas em tubos contendo BHI (Brain-Heart

Infusion - Oxoid[®]), e novamente incubadas, em anaerobiose, a 37°C por 24 horas (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1988). Após o crescimento em caldo BHI, as culturas puras foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: prova de gelatinase, motilidade, fermentação de lactose, sacarose, rafinose, produção de indol, de lecitinase e de H₂S (CARTER et al., 1995).

4.2. Inoculação Experimental de *Clostridium perfringens*

4.2.1. Preparação do inóculo de *Clostridium perfringens* para o desafio

Para a realização do desafio experimental, foram preparados dois inóculos, sendo um para cada desafio proposto, utilizando-se a cepa padrão de *C. perfringens* ATCC 13124 (produtor de α -toxina).

Esta amostra foi multiplicada em vários vidros com caldo BHI a 37°C por 48h em anaerobiose e após este procedimento, foram centrifugadas e o sedimento reunido até atingir a concentração para 10⁶ UFC/mL. Estas foram mantidas sob refrigeração até o momento de seu uso no desafio.

Para a contagem do número de células bacterianas no inóculo, foi realizada uma diluição seriada e para tal, 1,0 mL deste foi diluído até 10⁻⁶ em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1% previamente esterilizados. Logo após as diluições, 1,0 mL de cada diluição foi semeado pelo método “pour plate” em placas de ágar SPS (Sulfito-Polimixina-Sulfodiazina - Oxoid[®]) previamente esterilizadas, incubadas em jarras anaeróbicas com o sistema Gas-Pack[®], a 37°C por 24h e, logo após foram realizadas a contagens do número de UFC/g.

4.2.2. Preparo das amostras

As amostras das diferentes farinhas de origem animal e vegetal chegaram ao laboratório, em sacos contendo 12,0 kg cada um. Cada um destes sacos foi dividido em quatro porções de 3,0 kg, com o intuito de facilitar a manipulação e homogeneização com os produtos químicos avaliados nesse experimento. Em seguida, as porções de

3,0 kg foram autoclavadas a 121°C por 15 min e logo após este processo, as amostras foram homogeneizadas para evitar a compactação. Após o resfriamento, foi adicionada uma quantidade suficiente de inóculo para obter uma concentração final de 10^4 UFC/g. Estes receberam os tratamentos com produtos químicos em diferentes doses e em dois períodos.

A contaminação experimental foi feita, manualmente, adicionando-se 20,0 mL do inóculo de *C. perfringens* para 1,0 kg dos ingredientes. De cada porção inicial, foram retiradas, aleatoriamente, quatro sub-amostras de 25,0 g para contagens de *C. perfringens*. Após a inoculação dos tratamentos, foram determinados os períodos de ação 24h e 5 dias para cada teste, sendo estes armazenados em temperatura ambiente dentro do laboratório. Para controle positivo, uma amostra de cada matéria-prima de ração foi apenas inoculada experimentalmente com *C. perfringens* e processada sem nenhum tratamento químico.

O processo de mistura de ração com o produto a ser testado foi realizado em um misturador experimental, o Labmixer, que é específico para dosagem e homogeneização de líquidos. Este equipamento foi previamente limpo e desinfetado com álcool 70%. O processo de limpeza foi realizado repetidamente a cada aplicação dos produtos e a cada ingrediente.

Todas as amostras foram inoculadas experimentalmente com *C. perfringens* 24h antes da aplicação dos produtos químicos e mantidos em condições laboratoriais. Lembrando que as amostras foram armazenadas em sacos autoclaváveis, hermeticamente fechados.

4.2.3. Dosagem de produto a base de formaldeído e ácidos orgânicos

Para a realização dessa etapa, foram utilizados dois ingredientes, um de origem animal (farinha de carne e ossos) e outro de uma mistura vegetal (60% de quirera de milho e 40% de farelo de soja), obtendo-se um total de 32 amostras analisadas para cada período de ação analisado.

Após a inoculação experimental de *C. perfringens*, os ingredientes foram submetidos ao tratamento com um produto denominado Salmex[®], que é constituído de uma mistura líquida de 21,43% de ácido propiônico e 78,57% de formaldeído, em dois períodos de ação, 24h e 5 dias.

Para esta etapa, avaliaram-se seis diferentes dosagens nos ingredientes de ração. As dosagens de 1,0; 2,0 e 3,0 g/kg foram utilizadas para a mistura vegetal, já na farinha de carne e ossos, as dosagens foram de 4,0; 5,0 e 6,0g/kg.

4.2.3.1. Contagem de *C. perfringens*

Após os diferentes períodos de ação foram realizadas as contagens de *C. perfringens* e para tal foram pesados 25,0g de cada amostra, sendo diluídas em 225 mL de água peptonada a 1% previamente esterilizadas e feitas diluições seriadas até 10^{-6} . Estas diluições foram submetidas a um choque térmico.

Posteriormente, alíquotas de 1,0 mL das diluições foram semeadas em placas, em duplicata, com meio SPS, pelo método “pour plate”. Após a semeadura, as placas foram incubadas em anaerobiose em jarras com sistema Gas-Pack[®], a 37°C por 48 horas (APHA, 2001).

4.2.3.2. Análise Estatística

Os dados obtidos com a contagem das UFC/g foram analisados estatisticamente pelos procedimentos da análise de variância e as médias foram comparadas pelo ensaio fatorial 8x2, com 2 fatores de variação, por meio do teste F, no nível de significância de 5%. Os resultados obtidos foram transformados na base $\text{Log}(x+5)$, para que os dados ficassem mais homogêneos. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos, Versão 1.0, 2010 (BARBOSA e MALDONADO JR, 2010).

4.2.4. Avaliação de diferentes produtos químicos na eliminação de *C. perfringens*

Quatro ingredientes que são utilizados para a fabricação de ração animal foram analisados, sendo três farinhas de origem animal (farinha de sangue e penas, farinha de vísceras e farinha de carne e osso), e uma mistura vegetal com 40% de farelo de soja e 60% de quirera de milho, totalizando 128 amostras para o teste com produtos químicos em ambos os períodos (24h e 5 dias).

As amostras inoculadas experimentalmente receberam três tratamentos com diferentes produtos químicos, sendo eles o formaldeído, ácidos orgânicos e Salmex[®], além destes tratamentos utilizou-se um controle positivo para comparação. A mistura de ácidos orgânicos utilizados foram o ácido fórmico na concentração de 43% de, 10% de ácido propiônico, 15% de lignosulfato de sódio e 32% de água, em dois períodos de ação, que foram 24h e cinco dias, sendo adicionados diferentes proporções de cada produto para cada 3,0 kg das diferentes farinhas. As concentrações do Salmex[®] e do formaldeído foram de 3,0 g/kg para a mistura de farelo de milho e soja e de 6,0 g/kg para as farinhas de origem animal (farinha de carne e ossos, farinha de sangue e penas e farinhas de vísceras). Já para os ácidos orgânicos, as concentrações usadas para a mistura vegetal e para as de origem animal foram de 4,0 g/kg e 8,0 g/kg, respectivamente.

4.2.4.1. Contagem de *C. perfringens*

Os procedimentos de preparação das culturas e de contagem seguiram as mesmas recomendações contidas no item 4.2.3.1 (APHA, 2001).

4.2.4.2. Análise Estatística

Os dados obtidos das contagens das UFC/g foram analisados estatisticamente pela análise de variância e as médias comparadas pelo ensaio fatorial 4x4, por meio do teste F, aos níveis de significância de 1% e 5%. Os resultados obtidos foram transformados na base $\text{Log}(x+5)$, para que os dados ficassem mais homogêneos.. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa AgroEstat - Sistema

para Análises Estatísticas de Ensaio Agronômicos, Versão 1.0, 2010 (BARBOSA e MALDONADO JR, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Clostridium perfringens* em amostras *in natura*

Das 80 amostras *in natura*, o *Clostridium perfringens* foi isolado em 17,5% amostras da Farinha de Carne e Ossos (FCO), 20% da Farinha de Sangue e Penas (FSP), 10% da Farinha de Vísceras (FV) e 12,5% das amostras de mistura vegetal (MV), confirmando os achados de ANNETT et al.(2002) que mostraram a proliferação de *C. perfringens*, inoculado experimentalmente, em amostras de ingredientes de origem vegetal. Já PRIÓ et al. (2006), verificaram a presença de *C. perfringens*, *Salmonella* spp. e *E. coli* em matérias primas que são usadas na produção de ração animal.

5.2. Avaliação de produto a base de formaldeído e ácidos orgânicos em farinha de carne e ossos e mistura vegetal

A média da população de *C. perfringens* no Controle Positivo (sem tratamento químico), para a mistura vegetal foi de $1,9 \times 10^4$ UFC/g, no primeiro período, e de $4,4 \times 10^4$ UFC/g, em 5 dias. Já para a farinha de carne e ossos, a contagem foi de $2,9 \times 10^4$ UFC/g e de $2,8 \times 10^4$ UFC/g, nos períodos de 24h e 5 dias, respectivamente. Conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Controle Positivo da mistura vegetal e da farinha de carne e ossos que foram inoculadas experimentalmente com *Clostridium perfringens* após 24h e 5 dias, em UFC/g.

Ingrediente	Repetição	Período de Ação (24h)	Período de Ação (5 dias)
MV ⁽¹⁾	1	$1,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
MV	2	$1,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
MV	3	$3,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^5$
MV	4	$2,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$
MÉDIA	-	$1,9 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$
FCO	1	$4,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
FCO	2	$3,2 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$
FCO	3	$9,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$
FCO	4	$3,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
MÉDIA	-	$2,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$

⁽¹⁾ MV= Mistura Vegetal; FCO= Farinha de Carne e Ossos.

Os resultados da contagem das colônias de *C. perfringens* nas amostras tratadas com várias dosagens do Salmex[®], em dois períodos de ação, demonstraram que quanto maior a dosagem e o tempo de ação do produto, mais eficiente foi essa ação do produto. As dosagens de 1,0g/kg; 2,0g/kg e 3,0g/kg apresentaram populações de $1,85 \times 10^3$ UFC/g, de $3,9 \times 10^3$ UFC/g e de $1,1 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente, em 24h de ação do Salmex[®] na mistura vegetal. Já no período de ação de 5 dias, a média da população foi de $1,3 \times 10^4$ UFC/g para a dosagem de 1,0g/kg, de $2,7 \times 10^3$ UFC/g para 2,0g/kg, e de $3,75 \times 10^2$ UFC/g para 3,0 g/kg de Salmex[®].

O ingrediente de origem animal foi tratado com três dosagens diferentes: 4,0g/kg; 5,0g/kg e 6,0g/kg. Esses valores foram maiores, pois as farinhas de origem animal são um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (MAZUTTI et al., 2008). Em 24h de ação do produto avaliado, as populações para as diferentes dosagens foram de $1,25 \times 10^2$ UFC/g para 4,0g/kg, $3,0 \times 10^3$ UFC/g para a dose de 5,0g/kg e $1,4 \times 10^4$ UFC/g para 6,0g/kg. No quinto dia de ação do Salmex[®], a dosagem de 4,0g/kg inibiu o desenvolvimento de *C. perfringens*, já as doses de 5,0g/kg e de 6,0g/kg apresentaram os valores de $7,5 \times 10^2$ UFC/g e de $6,25 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente. Este fato pode ter ocorrido devido ao efeito de uma deficiente

homogeneização na aplicação manual da cultura usada como desafio *C. perfringens* nos ingredientes, a qual pode ter permitido a formação de grumulos facilitando a sobrevivência do agente.

Um estudo realizado por ALBUQUERQUE et al. (1998) teve como um dos objetivos comparar produtos comerciais compostos por ácidos orgânicos, com diferentes dosagens, em rações, sob a inoculação experimental de *Salmonella* spp. Esses autores concluíram que os ácidos orgânicos apresentaram comportamentos diferentes para a ação bactericida, pois dependeram do produto e da concentração que foram utilizados.

Tabela 2. População de *Clostridium perfringens* (UFC/g) em Farinha de Carne e Ossos e Mistura Vegetal nos períodos de 24h e 5 dias, após a ação do produto Salmex® em dosagens pré-estabelecidas.

Ingredientes	Repetição	Dose (g/kg)	Período de Ação (24h)	Período de Ação (5 dias)
MV ⁽¹⁾	1	1	$1,0 \times 10^3$	0
MV	2	1	$4,4 \times 10^3$	0
MV	3	1	$3,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$
MV	4	1	$1,7 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4$
MÉDIA	-	-	$1,85 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$
MV	1	2	$2,7 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$
MV	2	2	0	$7,5 \times 10^3$
MV	3	2	$1,2 \times 10^4$	0
MV	4	2	$7,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$
MÉDIA	-	-	$3,9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
MV	1	3	0	$1,5 \times 10^3$
MV	2	3	$3,1 \times 10^4$	0
MV	3	3	$1,1 \times 10^4$	0
MV	4	3	$3,5 \times 10^3$	0
MÉDIA	-	-	$1,1 \times 10^4$	$3,75 \times 10^2$
FCO	1	4	0	0
FCO	2	4	0	0
FCO	3	4	0	0
FCO	4	4	$5,0 \times 10^2$	0
MÉDIA	-	-	$1,25 \times 10^2$	0
FCO	1	5	0	0
FCO	2	5	0	0
FCO	3	5	$4,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
FCO	4	5	$8,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
MÉDIA	-	-	$3,0 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$
FCO	1	6	$8,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$
FCO	2	6	$2,2 \times 10^4$	0
FCO	3	6	$2,3 \times 10^4$	0
FCO	4	6	$2,2 \times 10^3$	0
MÉDIA	-	-	$1,4 \times 10^4$	$6,25 \times 10^2$

⁽¹⁾MV= Mistura Vegetal; FCO= Farinha de Carne e Ossos.

Tabela 3 demonstra o resumo da análise estatística realizada neste experimento. Entre os fatores de variação avaliados, foi apenas encontrada diferença significativa, ao nível de 1%, somente entre os tratamentos. O efeito do dia não interferiu no resultado final já que apresentou $p=0,0548$. A interação entre tratamento *versus* dia não foi significativa ($p=0,1285$), demonstrando assim, que estes fatores são independentes entre si.

Tabela 3. Análise de variância para os fatores de variação do tratamento e período de ação e o efeito entre a interação tratamento *versus* período de ação.

FV	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento (A)	7	82,254	11,751	7,91**	< 0,0001
Período de ação (B)	1	5,759	5,759	3,88 ^{NS}	0,0548
Interação AxB	7	17,812	2,545	1,71 ^{NS}	0,1285
Média Geral = 2,844					
D.P. = 1,219					
E.P.M. = 0,610					
C.V. = 42,865					

** significativo a 1 % de probabilidade; * significativo a 5 % de probabilidade; ns = não significativo.

A Tabela 4 mostra as médias estatísticas com relação aos diferentes tratamentos, tais como mistura vegetal com Salmex[®] nas dosagens de 1,0g/kg; 2,0g/kg e 3,0g/kg e farinha de carne e osso com o mesmo produto, porém em dosagens diferentes (4,0g/kg; 5,0g/kg e 6,0g/kg) e o controle positivo de ambos os ingredientes (mistura vegetal e farinha de carne e ossos), em relação aos dois períodos de ação do produto (24h e 5 dias).

Tabela 4. Comparações de médias do controle positivo e dos tratamentos com as diferentes dosagens.

Tratamento⁽³⁾	Média em $\log_{10}(x+5)$
1	2,824 abc ⁽¹⁾
2	2,722 bc
3	2,259 c
4	0,949 c
5	2,201 c
6	2,688 bc
7	4,705 a
8	4,404 ab
teste F	7,91 (p<0,0001)
DMS (5%)	1,931
Período de ação	Média em $\log_{10}(x+5)$
24h	3,144 a
5 dias	2,544 a
teste F	3,88 (p=0,0548)
DMS (5%)	0,613

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste f, sendo $\alpha=5\%$).

⁽²⁾DSM= Diferença mínima significativa para comparação das médias.

⁽³⁾1= Mistura Vegetal com Salmex[®]1.0g/kg; 2= Mistura Vegetal com Salmex[®]2.0 g/kg; 3= Mistura Vegetal com Salmex[®]3.0g/kg; 4= Farinha de Carne e Osso com Salmex[®]4.0g/kg; 5= Farinha de Carne e Osso com Salmex[®]5.0 g/kg; 6= Farinha de Carne e Osso com Salmex[®]6.0g/kg; 7= Controle Positivo Mistura Vegetal ; 8= Controle Positivo Farinha de Carne e Osso.

Valor do teste F para cada interação analisadas	
Tratamento x Período de ação	1,71 (p=0,1285)

Como não houve significância na interação estatística, os dados não necessitaram ser submetidos ao desdobramento estatístico.

Os tratamentos 2 e 6 apresentaram igualdade estatística, já os tratamentos 3, 4 e 5 obtiveram um resultado satisfatório sendo estes semelhantes entre si. Os controles positivos tanto da mistura vegetal como da farinha de origem animal (7 e 8) apresentaram as médias de contagem superior aos demais tratamentos sendo iguais estatisticamente. Em peculiaridade, o tratamento 1 apresentou resultados semelhantes a todos os outros. E com relação à ação do produto, observou-se que não houve diferenças significativas entre 24h e 5 dias de ação dos produtos (Tabela 4).

O produto Salmex[®] quando utilizados para o controle de *Salmonella* spp. apresentou ação eficaz, impedindo o crescimento deste microrganismo, quando em dosagens variando de 1,0l/ton a 6,0l/ton (ALBUQUERQUE et al., 1998). Porém no presente experimento, o Salmex[®] obteve uma menor contagem da população de *C. perfringens* nas dosagens de 3,0g/kg; 4,0g/kg; 5,0g/kg e 6,0g/kg.

5.3. Avaliação da eficiência de produtos químicos em ingredientes de ração

Os resultados do Controle Positivo (sem tratamento químico), e dos tratamentos com formaldeído, ácidos orgânicos e Salmex[®], nos períodos de 24h e 5 dias, mostraram que o tratamento com formaldeído foi o mais eficiente, diminuindo a população inicial, em relação ao controle positivo, de 24h em, aproximadamente, 99,27% e no período de 5 dias de ação essa porcentagem subiu para 99,91%. Já o tratamento com ácidos orgânicos obteve um resultado menos eficiente demonstrando que houve um ligeiro aumento na contagem de 2,78% no período de 24h, tendo uma redução na contagem de 70,72% em 5 dias em, relação ao controle positivo. A eficiência do Salmex[®] foi de 98,81% em 24 horas e de 99,97%, aproximadamente, com o período de ação de 5 dias. O controle positivo teve um leve aumento no número em 24h, talvez devido a permanência de umidade por causa da mistura do inóculo. Já em 5 dias, essa população sofreu uma leve redução, provavelmente devido a baixa atividade de água.

Vale salientar que o formaldeído quando utilizado de forma isolada, é altamente volátil, podendo ser perdido por evaporação após a aplicação na ração (KHAN et al, 2003), e assim perdendo possivelmente um pouco de sua ação bactericida quando utilizado na prática. Em contrapartida, alguns produtos provindos da combinação de formaldeído, ácidos orgânicos (ácido propiônico) e outros compostos antimicrobianos como os terpenos (CARRIQUE-MAS et al, 2007) possuem um efeito sinérgico, permitindo que baixas doses de formaldeído e ácidos sejam aplicados, minimizando assim problemas de fumigação no ar ambiente e riscos de intoxicação do operador e corrosão dos equipamentos.

Os resultados detalhados de cada tratamento estão expressos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Contagem de colônias de *Clostridium perfringens* no Controle Positivo e nos tratamentos com Formaldeído, Ácidos Orgânicos e Salmex® nas Farinhas de Carne e Ossos, Sangue e Penas e Vísceras e Mistura Vegetal, inoculadas experimentalmente com este agente após o período de ação de 24h, em UFC/g.

Período de Ação – 24h					
Ingredientes	Repetição	Controle Positivo	Tratamento Formaldeído	Tratamento Ácidos Orgânicos	Tratamento Salmex®
MV ⁽¹⁾	1	4,0 x 10 ⁵	0	1,7 x 10 ⁶	0
MV	2	9,0 x 10 ⁵	0	2,4 x 10 ⁵	0
MV	3	4,0 x 10 ⁵	0	4,4 x 10 ⁵	7,0 x 10 ³
MV	4	5,1 x 10 ⁵	2,5 x 10 ³	3,8 x 10 ⁵	2,5 x 10 ³
MÉDIA	-	5,5 x 10⁵	6,2 x 10²	6,9 x 10⁵	2,4 x 10³
FCO	1	5,1 x 10 ⁵	0	1,8 x 10 ⁶	1,4 x 10 ³
FCO	2	3,8 x 10 ⁵	0	2,1 x 10 ⁵	4,5 x 10 ²
FCO	3	2,3 x 10 ⁵	5,0 x 10 ¹	4,5 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁴
FCO	4	3,7 x 10 ⁵	1,75 x 10 ⁴	7,1 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴
MÉDIA	-	3,7 x 10⁵	4,4 x 10³	1,64 x 10⁶	1,3 x 10⁴
FSP	1	2,3 x 10 ⁶	5,0 x 10 ¹	8,3 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁴
FSP	2	3,6 x 10 ⁶	0	7,1 x 10 ⁴	1,0 x 10 ³
FSP	3	9,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ²	7,1 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁴
FSP	4	2,2 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁵	0
MÉDIA	-	2,2 x 10⁶	1,2 x 10⁴	5,0 x 10⁵	1,9 x 10⁴
FV	1	3,3 x 10 ⁵	0	1,6 x 10 ⁶	3,0 x 10 ²
FV	2	3,1 x 10 ⁵	0	3,2 x 10 ⁵	0
FV	3	5,4 x 10 ⁵	5,5 x 10 ²	1,3 x 10 ⁶	3,3 x 10 ⁴
FV	4	8,2 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁵	0
MÉDIA	-	5,0 x 10⁵	9,4 x 10³	8,7 x 10⁵	8,6 x 10³
MÉDIA TOTAL	-	9,0 x 10⁵	6,6 x 10³	9,25 x 10⁵	1,07 x 10⁴

⁽¹⁾MV= Mistura Vegetal; FCO= Farinha de Carne e Ossos; FSP=Farinha de Sangue e Penas; FV=Farinha de Vísceras.

Tabela 6. Contagem de colônias de *Clostridium perfringens* no Controle Positivo e nos tratamentos com Formaldeído, Ácidos Orgânicos e Salmex® nas Farinhas de Carne e Ossos, Sangue e Penas e Vísceras e Mistura Vegetal, inoculadas experimentalmente com este agente após o período de ação de 5 dias, em UFC/g.

Período de Ação - 5 dias					
Ingredientes	Repetição	Controle Positivo	Tratamento Formaldeído	Tratamento Ácidos orgânicos	Tratamento Salmex®
MV ⁽¹⁾	1	$1,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^5$	0
MV	2	$3,0 \times 10^4$	0	$8,6 \times 10^4$	0
MV	3	$2,4 \times 10^5$	0	$3,8 \times 10^5$	0
MV	4	$1,9 \times 10^4$	0	$1,3 \times 10^5$	0
MÉDIA	-	$7,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$2,9 \times 10^5$	0
FCO	1	$7,0 \times 10^4$	0	$2,7 \times 10^5$	$5,5 \times 10^2$
FCO	2	$1,2 \times 10^4$	0	$1,6 \times 10^5$	0
FCO	3	$5,0 \times 10^4$	0	$2,5 \times 10^4$	0
FCO	4	$5,2 \times 10^4$	0	0	0
MÉDIA	-	$4,6 \times 10^4$	0	$1,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^2$
FSP	1	$6,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	0
FSP	2	$1,5 \times 10^6$	0	$1,1 \times 10^5$	0
FSP	3	$9,0 \times 10^5$	0	$2,4 \times 10^5$	0
FSP	4	$6,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$	0
MÉDIA	-	$2,3 \times 10^6$	$9,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^5$	0
FV	1	$8,0 \times 10^4$	0	$7,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^2$
FV	2	$2,1 \times 10^5$	0	$9,5 \times 10^4$	0
FV	3	$4,3 \times 10^5$	0	$1,2 \times 10^5$	0
FV	4	$5,1 \times 10^5$	$1,55 \times 10^3$	$9,0 \times 10^4$	0
MÉDIA	-	$3,1 \times 10^5$	$3,9 \times 10^2$	$2,5 \times 10^5$	$6,2 \times 10^1$
MÉDIA TOTAL	-	$6,83 \times 10^5$	$6,2 \times 10^2$	$2,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$

⁽¹⁾ MV= Mistura Vegetal; FCO= Farinha de Carne e Ossos; FSP=Farinha de Sangue e Penas; FV=Farinha de Vísceras.

A avaliação da estatística neste experimento demonstrou que houve diferença estatística entre os tratamentos e os períodos de ação dos produtos ($p < 0,0001$), já os diferentes ingredientes foram semelhantes estatisticamente entre si ($p = 0,0580$). No nível de 5% de significância, foi encontrada uma diferença somente entre a interação produto *versus* dia ($p = 0,0378$). As demais interações foram estatisticamente

semelhantes, ou seja, são independentes umas das outras. A análise de variância da estatística apresentou a média geral de 3,585, o desvio padrão foi igual a 1,044, o coeficiente de variação foi de 29,111.

A Tabela 7 mostra as médias estatísticas com relação aos ingredientes (Mistura Vegetal; Farinha de Carne e Osso; Farinha de Sangue e Penas; Farinha de Vísceras), aos produtos (Formaldeído; Ácidos orgânicos; Salmex[®]; Controle Positivo) e com relação aos dois períodos de ação dos produtos (24h e 5 dias).

Tabela 7. Comparações das médias em relação aos produtos, ingredientes e períodos.

Tratamento⁽³⁾	Médias em $\log_{10}(x+5)^{(1)}$
1	5,491 a
2	1,662 b
3	5,284 a
4	1,905 b
teste F	127,66 (p<0,0001)
DMS (5%) ⁽²⁾	0,6822
Ingrediente⁽⁴⁾	Médias em $\log_{10}(x+5)^{(1)}$
1	3,398 a
2	3,381 a
3	4,015 a
4	3,547 a
teste F	2,58 (p=0,058)
DMS (5%)	0,6822
Período	Médias em $\log_{10}(x+5)$
24h	4,091 a
5 dias	3,079 b
teste F	30,06 (p<0,0001)
DMS (5%)	0,3662

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste f, sendo $\alpha=5\%$).

⁽²⁾DSM= Diferença mínima significativa para comparação das médias.

⁽³⁾1= Controle Positivo; 2= Formaldeído; 3=Ácidos orgânicos; 4= Salmex[®].

⁽⁴⁾1= Mistura Vegetal; 2= Farinha de Carne e Osso; 3= Farinha de Sangue e Penas; 4= Farinha de Vísceras.

Valor do teste F para cada interação analisadas	
Produto x Ingrediente	1,19 (p=0,3108) ^{ns}
Produto x Período	2,92 (p=0,0378)*
Ingrediente x Período	1,36 (p=0,2597) ^{ns}
Produto x Ingrediente x Período	0,99 (p=0,4531) ^{ns}

* Interação significativa ao nível de 5% e ^{ns}= não significativo.

Entre os produtos analisados, houve uma diferença estatística significativa no nível de 1%. O formaldeído e o Salmex[®] obtiveram um comportamento estatisticamente semelhante entre si, porém os mesmos diferiram dos ácidos orgânicos e do controle positivo. Os tratamentos a base de formaldeído e Salmex[®] tiveram uma média de contagem de colônias inferior aos demais tratamentos, demonstrando uma maior eficácia desses produtos.

Os ingredientes de origem animal e vegetal não apresentaram diferença significativa entre eles ($p=0,0580$).

Entre os dois períodos avaliados, houve uma diferença significativa ($p<0,0001$), sendo que no segundo período (5 dias) observou-se uma menor média das contagens comparada com o primeiro (24h), isso mostra que o tempo de incubação é importante para a ação. Conforme WALES et al. (2010), o tempo de ação do produto afeta diretamente a eficiência, além de que são necessários altos níveis de ácidos orgânicos nos ingredientes de rações, para alcançar reduções significativas de contaminação. IBA e BERCHIERI (1995) trabalhando com ácidos orgânicos demonstraram que para reduzir a população microbiana na ração foi necessário um longo período de contato para inibir qualquer tipo de bactéria.

Como houve significância somente entre a interação produto *versus* dia ($p=0,0378$) foi realizado um desdobramento estatístico para análise desses dados, conforme é observado na Tabela 8.

Tabela 8. Comparações de médias do desdobramento da interação significativa produto *versus* período de ação.

Período de ação ⁽³⁾	Tratamento ⁽²⁾				Teste F
	1	2	3	4	
24h	5,810 Aa ⁽¹⁾	1,963 Ab	5,716 Aa	2,875 Ab	56,79 ($p<0,0001$) ⁽⁴⁾
5 dias	5,171 Aa	1,361 Ab	4,851 Ba	0,934 Bb	73,80 ($p<0,0001$) [*]
Teste F	2,99 ($p=0,0869$) ^{ns}	2,66 ($p=0,1061$) ^{ns}	5,49 ($p=0,0212$) [*]	27,70 ($p<0,0001$) [*]	

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si (teste f, sendo $\alpha=5\%$).

⁽²⁾ 1= Controle Positivo; 2= Formaldeído; 3= Ácidos orgânicos; 4= Salmex[®].

⁽³⁾ 1= 1 dia de incubação; 2= 5 dias de incubação.

⁽⁴⁾ * = significativo pelo teste F a 5% e ^{ns}= não significativo.

Apesar de haver uma ligeira redução das médias no tratamento 2 (formaldeído), não houve diferença estatística quando comparamos dentro dos diferentes tempos de

ação do formaldeído. No tratamento 1 (controle positivo), as médias obtiveram uma pequena redução porém não foram diferentes estatisticamente.

Já os produtos 3 (ácidos orgânicos) e 4 (Salmex[®]) apresentaram uma notável diminuição de médias demonstrando que, no decorrer do tempo de incubação, foram diferentes no nível de 5% e de 1% de significância, respectivamente, indicando que os dois produtos estão fortemente correlacionados com o efeito do tempo de ação.

A ação dos ácidos orgânicos na eliminação de bactérias ocorre pela penetração nas células bacterianas pela dissociação em cátions (+) e ânions (-). Os íons catiônicos são responsáveis por reduzir o pH interno das bactérias, consumindo, assim, sua energia, e, conseqüentemente, levando estas células à morte. Já a forma aniônica se difunde livremente por meio da parede celular, tornando-se tóxico em sua forma dissociada (LAMBERT e STRATFORD, 1999 citado por BASSAN et al., 2008).

Num estudo realizado por DIEBOLD e EIDELSBURGER (2006) citado por WALES et al. (2010), foi demonstrada a eficácia dos ácidos orgânicos, através da concentração inibitória mínima, sobre a *Salmonella* Typhimurium, sendo mais eficaz o ácido fórmico, seguido pelo ácido propiônico e finalmente o láctico. A ação antimicrobiana, especificamente, dos ácidos orgânicos, está associada à concentração, ao pH do ambiente e ao tipo de microrganismo (DIBNER e BUTTIN, 2002; WALES et al., 2010).

A sensibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos, ácidos orgânicos, é determinada pelo tipo de microrganismo, pela variação da tensão e pela formação de esporos (HEINZEL, 1998 citado por RICKE, 2003). Enquanto que o modo de ação do formaldeído ocorre devido à capacidade de inativar constituintes celulares como proteína e ácidos nucléicos (PELCZAR, et al., 1997).

No presente estudo a bactéria utilizada foi o *C. perfringens*, que é uma espécie Gram positiva e esporulada (TORTORA et al., 2005), sendo assim mais resistente a ação inibitória.

Neste estudo, os ácidos orgânicos em associação com o formaldeído mostraram-se mais eficiente quando comparados com a utilização somente de ácidos orgânicos. CARRISQUE-MAS et al. (2007) obtiveram a eliminação da contaminação de *Salmonella*

sp, em rações inoculadas com 10^2 e 10^4 UFC/g, quando foi aplicada uma associação de ácidos propiônico e formaldeído, durante o período de 24h.

KHAN et al. (2003) compararam os efeitos de formalina, em frangos com 10 semanas de idade, administrada de duas maneiras: uma misturando o formalina na ração nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10 mL/kg e outra administrando, por via oral, uma solução contendo 3 % de formalina, em diferentes dosagens (5, 10 15 e 20 ml/ave/dia). Ambas as maneiras foram realizadas simultaneamente durante 8 semanas. Após este período foram verificadas alterações corporais e comportamentais em tratamentos com alta dosagem de formalina, demonstrando assim que a toxicidade do formaldeído, para aves, depende da dosagem e da maneira como é administrada.

6. CONCLUSÃO

Das 80 amostras de ingredientes *in natura* destinados a fabricação de ração analisadas, 60% foram positivas para *Clostridium perfringens*, demonstrando a importância de se estudar a contaminação deste agente em ingredientes visando evitar perdas econômicas causadas pela doença provocada por este agente.

O Salmex[®] diminuiu a contagem da população de *C. perfringens* nas amostras que receberam doses acima de 3,0g/kg. Em 24h de ação deste produto houve a ausência de contagem em 29% das amostras, já no período de cinco dias esta porcentagem foi de 63%, demonstrando que o tempo é um fator importante para a ação do Salmex[®].

Entre os tratamentos com os diferentes produtos químicos, formaldeído, ácidos orgânicos e Salmex[®], as amostras tratadas com formaldeído e com Salmex[®] obtiveram uma melhor eficiência na inibição do *C. perfringens* em ambos os períodos avaliados, 24h e cinco dias, quando comparados com a mistura de ácidos orgânicos.

7. REFERÊNCIAS

ABEF, Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. Relatório Anual 2009/2010. Disponível em:<www.abef.com.br> Acessado em 1 dezembro. 2011.

ALBUQUERQUE, R.; ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bacteriana e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella* spp. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 279-282, 1998.

ALVES FILHO, E.; ARAÚJO, M. da P. **Origens e desenvolvimento do sistema de produção integrada no Brasil.** In: CASIMIRO FILHO, F.; SHIKIDA, P. F. A. Coord. Agronegócio e Desenvolvimento Regional. Cascavel: Edunioeste, 1999.

ANNETT, C. B.; VISTE, J. R.; CHIRINO-TREJO, M.; CLASSEN, H. L.; MIDDLETON, D. M.; SIMKO E. Necrotic enteritis: Effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathology*, v. 31, p. 599–602, 2002.

APHA, American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological of foods.** 4th ed. Washington 2001.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W.; AgroEstat – **Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos**, Versão 1.0, 2010.

BASSAN, J. D. L.; FLÔRES, M. L.; ANTONIAZZI, T.; BIANCHI, E.; KUTTEL, J.; MARTINS TRINDADE, M. M. Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. *Ciência Rural*, v. 38, n. 7, p. 1961-1965, 2008.

BELLAVER, C. Ingredientes de origem animal destinados à fabricação de rações In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: 2001, p.167-190.

BELLAVER, C. Uso de resíduos de origem animal na alimentação de frangos de corte. In: III SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2002, Chapecó, SC. **Anais...** 2002, p.6-22.

BELLAVER, C. A importância da gestão da qualidade de insumos para rações visando a segurança dos alimentos. In: Simpósio de Segurança dos Alimentos. 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: 2004, p.1-19.

BELLAVER, C. Limitações e vantagens do uso de farinhas de origem animal na alimentação de suínos e de aves. In: II Simpósio Brasileiro Alltech da Indústria de Alimentação Animal. 2005, Curitiba, PR, **Anais...** Curitiba, PR, 2005, p.1-15.

BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**. 2ed. Campinas. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. 1103p.

CARRIQUE-MAS, J.J.; BEDFORD, S.; DAVIES, R.H. Organic acid and formaldehyde treatment of animal feeds to control *Salmonella*: efficacy and masking during culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 88–96, 2007.

CARTER, G.R. et al. **Essentials of veterinary microbiology**. 5.ed. London: Williams & Wilkins, 1995. 394p.

COSTA, D. P. S.; ROMANELLI, P. F.; TRABUCO, E. Aproveitamento de vísceras não comestíveis de aves para elaboração de farinha de carne. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p.746-752, 2008.

CUSTÓDIO, D. P.; BRANDSTETTER, E. V.; OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; SANTOS, K. J. G.; MACHADO, O. F.; ARAUJO, A. A. Ração: alimento animal perecível. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n. 2, p. 131-147, 2005.

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

FIGUEIREDO, E. A. P. Como está a avicultura brasileira. **Revista Brasileira de Agropecuária**, v. 2, n. 13, p. 12-16, 2001.

GADZINSKI, P.; JULIAN, R.J. Necrotic enteritis in turkeys. **Avian Diseases**. v.36, p.792-798, 1992.

GOMES, M. J. P.; Gênero *Clostridium* spp. Disponível em: <www6.ufrgs.br/labacvet/files/Clostridium201102.pdf>. Acesso em 30, maio. 2011. In: **Microbiologia Clínica LABACVET** , II, 2007.

GONZALES, E. **Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves**. São Paulo: UNESP, 2004, p. 56.

IBA, A.M.; BERCHIERI, A. Studies on the use of a formic acidpropionic acid mixture (Bio-Add(tm)) to control experimental Salmonella infection in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 24, p. 303-311, 1995.

KHAN, M. Z.; ALI, Z.; MUHAMMAD, G.; KHAN, A.; MAHMOOD F. Pathological effects of formalin (37% formaldehyde)mixed in feed or administered into the crops of white leghorn cockerels. **Journal of Veterinary Medical**, v. 50, p. 354–358, 2003.

LONGO, F. A.; SILVA, I. F.; LANZARIN, M. A. A importância do controle microbiológico em rações para aves. In: XI SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA E II BRASIL SUL POULTRY FAIR. 2010, Chapecó, SC. **Anais...** 2010, p.36-63.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N°34. Brasília, 2008. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 de Outubro de 2011.

MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; Di LUCCIO, M. Esterilização de farinha de subprodutos animais em esterilizador industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2008.

NILLO, L. *Clostridium perfringens* in Animal Disease: A Review of Current Knowledge. **The Canadian Veterinary Journal**. v.21, n.5, p. 141-148, 1980.

NUNES. R. V.; POZZA, P. C.; NUNES, C. G. V.; CAMPESTRINI, E.; KÜHL, R.; ROCHA, L. D. DA; COSTA, F. G. P. Valores Energéticos de Subprodutos de Origem Animal para Aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1217-1224, 2006.

OLIVEIRA, M.C. de; CANCHERINI, L.C.; MARQUES, R.H.; GRAVENA, R.A.; MORAES, V.M.B. de. Mananoligossacarídeos e complexo enzimático em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.879-886, 2009.

OSTERMANN, P.; SANFELICE, A.M.; VIEIRA, S. L.; VIOLA, E. S. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. **Ave World: A Revista do Agricultor Moderno**, ano 3, n.15, p.28-31, 2005.

PADILHA, A.C.M.; LEAVY, S.; SAMPAIO, A.; JERÔNIMO, F.B. Gestão ambiental de resíduos da produção na Perdigão Agroindustrial S/A - Unidade Industrial de Serafina Corrêa – RS. In: XLIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E

SOCIOLOGIA RURAL, “Instituições, Eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”, **Anais...** Ribeirão Preto: SOBER, p.1-15, 2005.

PARSONS, C.M.; ZHANG, Y.; ARABA, M. Nutritional evaluation of soybean meals varying in oligosaccharide content. **Poultry Science**, v.79, p.1127-1131, 2000.

PARTANEN, K.H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition research review**, v.12, p.117-145, 1999.

PELCZAR, Jr., M. J. ; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª edição; São Paulo-SP: Makron Books, 1997, v. 1, p. 190-252.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciência de la carne y de los productos carnicos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 581 p.

PRIÓ P.; GASOL R.; SORIANO R. C.; PEREZ-RIGAU A. Effect of raw material microbial contamination over microbiological profile of ground and pelleted feeds. In: **Brufan J. (Ed.): From Feed to Food**, p. 197-199, 2006.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, p. 632–639, 2003.

RIDDELL, C.; KONG, X. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Diseases**. v.36, p.499 -/503, 1992.

ROSTAGNO, H.S. Disponibilidade de nutrientes em grãos de má qualidade. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, 1993. **Anais...** Campinas: FACTA, 1993, p.129-39.

SANTOS, E. J. DOS; CARVALHO, E. PINHEIRO DE; SANCHES, R. L.; BARRIOS, B. E. B. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no estado de

Minas Gerais para produção de ração animal. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.425-433, 2000.

SANTOS, J. R. G. DE LOS; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.7, p.2076-2082, 2008.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. et al. Isolation and characterization of pathogenic *Clostridium* in meat products. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.4, n.1, p.91-98, 1988.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ISHI, M.; VITTORI, J. Clostridioses em aves. In: BERCHIERI, A. JR.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2 ed. p.1104, Campinas - SP, 2009.

SILVA, E. P. da. **Avaliação nutricional de farinhas de Vísceras de aves e a utilização em Rações de frangos de corte**. 2009, 135f., Dissertação (*Magister Scientiae*) em Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SHUTTE, J.B.; Van KEMPEN, G.J.M.; HAMER, R.J. Possibilities to improve the utilization of feed ingredients rich in non-starch polysaccharides for poultry. In: CONFERENCIA EUROPEA DE AVICULTURA, 8., 1990, Barcelona. **Anais...** Barcelona: 1990. p.128-133.

SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br>>. Acesso em: 10 outubro 2011.

STRADA, E. S. DE O.; ABREU, R. D.; OLIVEIRA, G. J. C. DE; COSTA, M. DO C. M. M. DA; CARVALHO, G. J. L. DE; FRANCA, A. S.; CLARTON, L.; AZEVEDO, J. L. M. DE. Uso de Enzimas na Alimentação de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2369-2375, 2005.

TAVARES, L. de P.; RIBEIRO, K. C. de S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, Lavras, v. 9, n. 1, p. 79-88, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8^a ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2005.920p.

TINÔCO, I. F.F. Avicultura Industrial: Novos Conceitos de Materiais, Concepções e Técnicas Construtivas Disponíveis para Galpões Avícolas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.3, n.1, Campinas, 2001.

VAN IMMENSEEL, F. et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**. v.33, n.6, p.537-549, 2004.

WALES, A. D.; ALLEN, V. M.; DAVIES, R. H. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 1, p. 03-15, 2010.