

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CONTROLE DE *Salmonella* Typhimurium EM FRANGOS DE CORTE
UTILIZANDO COMPOSTO COM ÁCIDO BENZÓICO, FUMÁRICO E 2-HIDRÓXI-
METILTIO-BUTANÓICO**

Tatiane Martins Rocha
Orientador: Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

**GOIÂNIA
2008**



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações - BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica trazida eira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: Tatiane Martina Rocha CPF: E-mail: tatvet2@gmail.com

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vinholo Empregado co autor: Nenhum Agência de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

País: Brasil UF:GO CNPq: Sigla: CNPq

Título: Controle de *Salmonella Typhimurium* em frangos de corte utilizando composto com ácido benzoíco, fumárico e 2-hidróxi-metilíco-butanóico.

Palavras-chave: aves, contaminação, controle, conversão alimentar, salmonelose.

Título em outra língua: Control of *Salmonella Typhimurium* in broilers using blend of acid benzoic, fumaric, and 2-hydroxy metilico-butanic.

Palavras-chave em outra língua: birds, contamination, control, feed-to-gain ratio, salmonellosis.

Área de concentração: Sanidade Animal Data defesa: (dd/mm/aaaa) 24/07/2008

Programa de Pós-Graduação: Ciência Animal

Orientador(a): Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade CPF: E-mail: maa@vet.ufg.br

Co-orientador(a): José Henrique Stringhini CPF: E-mail: jhstringhini@uol.com.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, descreva as permissões:

[+] Capítulos. Especifique: -

[+] Outras restrições: -

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contenham eletronicamente as teses e ou dissertações, antes da sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 11 de agosto de 2008

Tatiane Martina Rocha
Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data da defesa. A exceção desse prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo recurso e material serão sempre disponibilizados.

TATIANE MARTINS ROCHA

**CONTROLE DE *Salmonella Typhimurium* EM FRANGOS DE CORTE
UTILIZANDO COMPOSTO COM ÁCIDO BENZÓICO, FUMÁRICO E 2-HIDRÓXI-
METILTIO-BUTANÓICO**

Dissertação apresentada
para obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal
junto a Escola de Veterinária
da Universidade Federal de
Goiás.

Área de Concentração
Sanidade Animal

Orientadora
Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. José Henrique Stringhini
Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

GOIÂNIA
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Rocha, Tatiane Martins.

R672c Controle de *Salmonella Typhimurium* em frangos de corte utilizando composto com ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metiltio-butanóico [manuscrito] / Tatiane Martins Rocha. – 2008.
vii, 65 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária, 2008

Bibliografia.

1. Frango de corte – Contaminação – *Salmonella typhimurium*
 2. Frango de corte – *Salmonella typhimurium* – Controle
 3. *Salmonella typhimurium* – Controle
- I. Andrade, Maria Auxiliadora
II. Universidade Federal de Goiás. **Escola Veterinária.** III. Título.

CDU: 636.5.033:579.842

TATIANE MARTINS ROCHA

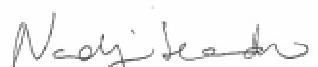
Dissertação defendida e aprovada em 24/07/2008, pela Banca
Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles – UNESP/Araçatuba – SP



Profa. Dra. Nadja Sôusana Mogyca Leandro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS porque sem Sua presença em minha vida eu nada seria capaz. Ele é o responsável por estar realizando este grande sonho.

Agradeço a meus pais pelo apoio e amor incondicional. Ao meu irmão pelo incentivo e carinho, minhas avós pelas lições de vida e paciência. E a todos os meus familiares que tiveram grande compreensão com meu espaço curto de tempo.

Agradeço especialmente ao Marcos Sotero Nunes, meu braço direito, meu maior incentivador e ajudador. E também a sua família grandes incentivadores, obrigada pelos momentos felizes.

Agradeço em especial a Iraci Eliezer Naves e Jonas dos Santos e seus familiares pela grande amizade e dedicação, pois sem este carinho e orações tudo seria muito difícil. E a Lúcia pela grande amizade e orações.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Profa Dra Maria Auxiliadora Andrade pelo auxílio, paciência e ensinamentos de vida durante o período de pós-graduação e de realização deste trabalho. Um presente de Deus em minha vida, de quem sou grande admiradora tanto pela competência e responsabilidade quanto pela característica humana.

Ao Prof. José Henrique Stringhini pelos ensinamentos durante o período de pós-graduação e também pelo auxílio tanto na montagem do delineamento experimental quanto pela ajuda em conseguir financiamento para este experimento.

Ao (A): Prof. Aires Manoel de Sousa, Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra, e Rezende, Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho, Prof. Dr. Guido F. Coelho Linhares, Prof. Dr. Jurij Sobestiansky, Prof. Dr. Marcos Barcellos Café, Profa Dra Maria Lúcia Gambarini Meirinhos, Profa Dra. Nadja S. Mogyca Leandro, Profa Dra Regiane Nascimento Gagno Porto, Profa Dra Valéria de Sá Jayme e a todos os professores pelo carinho, amizade e por apresentarem sugestões que muito contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Sr. Antônio e Sr. Enedino da fábrica de ração e Gerson pelo carinho, auxílio e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao amigo Leandro Silva Chaves por sua amizade, ensinamentos, auxílio e também pelos momentos descontraídos que sempre guardarei com muito carinho.

A grande amiga Eliete Silva e Souza, minha parceira nas análises bacteriológicas. Muito obrigada pelo auxílio, esforço e por tornar os momentos muito mais divertidos durante a execução do experimento e o curso de pós-graduação.

Aos estagiários: Ana Carolinne, André, Carlos Eduardo, Hérika, Iberê, Ítalo, Januária, Juliana, Natália, Pedro, Plínio, por sempre estarem dispostos a ajudar, verdadeiros parceiros e indispensáveis para execução deste experimento.

Aos amigos durante o período de pós-graduação: Alberto, Anderson, Candice, Cícera, Dona Aparecida, Dunya e esposo, Elenilson, Fernanda, Gracinda, Hilari, Joãozinho, Karina, Leonardo, Lívia, Lurdes, Maria Auxiliadora Leão, Maria Luiza, Michele, Mônica, Natali, Paulo, Sabrina, Tânia e a todos os meus amigos de turma pelos momentos que passei durante o curso.

Ao Alessandro Moraes Rocha e Dra. Simone Pophal pelo primeiro contato com a empresa e empenho para que o financiamento fosse aprovado.

A Novus especialmente à Dra. Liliana Oetting, pela assistência técnica e prontidão auxiliar. À Super Frango, especialmente ao Dr. Roberto de Moraes Jardim Filho e Leandro Silva Chaves pela doação dos pintos de um dia. E também ao CNPq pela bolsa de estudo.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás, à Escola de Veterinária e funcionários pelos ensinamentos e amizade, os quais sempre estavam prontos para esclarecimentos e sugestões.

E a todos que contribuíram para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
 CAPÍTULO 2 - Desempenho e saúde intestinal de frangos de corte inoculados com <i>Salmonella Typhimurium</i> ácido nalidíxico resistente e tratados com ácidos orgânicos.....	07
RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
INTRODUÇÃO.....	09
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
Aves e Instalações.....	12
Manejo Experimental.....	12
Manejo alimentar.....	13
Variáveis estudadas.....	13
Desempenho produtivo.....	14
Avaliação intestinal.....	14
Avaliação de pH intestinal.....	15
Análises Estatísticas.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÃO.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
 CAPÍTULO 3 - Avaliação da função hepática e bacteriologia de órgãos em frangos de corte inoculados com <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> e tratados com ácidos orgânicos.....	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
Aves e Instalações.....	45
Manejo Experimental.....	45
Manejo alimentar.....	46
Variáveis estudadas.....	47
Avaliação de função hepática.....	47
Biometria hepática.....	47
Avaliação histopatológica do fígado.....	47
Pesquisa de <i>S. Typhimurium</i>	48

Análises Estatísticas.....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÃO.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64

RESUMO

Foi conduzido um experimento utilizando-se 630 pintos com um dia de idade com o objetivo de avaliar os efeitos de ácidos orgânicos, frente à inoculação experimental de *Salmonella Typhimurium* sobre a saúde intestinal, desempenho, bacteriologia de órgãos e função hepática. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos e sete repetições com 15 pintos cada. O desafio experimental com a bactéria ocorreu por duas vias de administração: via inglúvio, ao primeiro dia após eclosão, e via ração durante o período de sete a 14 dias de idade. Estes grupos foram tratados ou não com ácidos orgânicos, definindo-se desta forma, um esquema fatorial de 3x2 (ágente versus ácidos orgânicos). Os pintos dos tratamentos preconizados para inoculação no primeiro dia de vida receberam via inglúvio, a dose de $5,0 \times 10^2$ /0,5mL unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella Typhimurium*. Os tratamentos com contaminação via ração, receberam o desafio na dosagem de $5,0 \times 10^2$ UFC de *Salmonella Typhimurium*/ kg de ração. O teste de Tukey (5%) foi utilizado para análises das variáveis. Os grupos tratados com ácidos orgânicos apresentaram melhores de ganho de peso, peso médio e conversão alimentar ($p<0,05$) aos 14, 21 e de ganho de peso e peso médio ($p<0,05$) aos 28 dias de idade. Os grupos inoculados com *Salmonella Typhimurium* apresentaram piores índices de desempenho ($p<0,05$) aos sete, 14 e 28 dias. O peso do intestino delgado foi maior ($p<0,05$) para os grupos inoculados quando comparado ao grupo controle, entretanto com comprimento menor para o mesmo fragmento intestinal. O tratamento inoculado via inglúvio e tratado com ácidos orgânicos apresentou menores valores ($p<0,05$) de unidades formadoras de colônia/g de *Escherichia coli* em excretas do que os grupos que foi comparado. O pH do conteúdo do conteúdo cecal e do intestino delgado não foi afetado ($p>0,05$) pela adição de ácido, enquanto o pH do intestino delgado dos grupos inoculados foi menor ($p<0,05$) quando comparado ao grupo controle negativo durante todo o período experimental. Também foi verificado menor peso ($p<0,05$) de fígado para os grupos controle negativo aos 21 e 28 dias. Os grupos tratados com ácido, independente da via de administração com *Salmonella Typhimurium*, obtiveram menores freqüências de isolamento em todos os órgãos analisados. Foram também observadas alterações ($p<0,05$) na bioquímica sérica hepática e na análise histopatológica do fígado pela atuação da *Salmonella*. Pode-se concluir que o ácido utilizado na dosagem de 0,4% potencializou o desempenho, foi eficaz no controle de *Salmonella Typhimurium* e não promoveu lesões hepáticas, quando da inoculação experimental de *Salmonella Typhimurium* ácido nalidíxico resistente.

Palavras-chave: aves, contaminação, controle, conversão alimentar.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

O gênero *Salmonella*, por suas características antigênicas, está agrupado em aproximadamente 2500 sorovares que são capazes de infectar, além do homem, uma grande variedade de animais homeotérmicos ou heterotérmicos, que se identificam na cadeia epidemiológica como doente portador e reservatório (POPOFF et al., 1998).

As salmonelas paratípicas causam infecção principalmente em aves jovens que poderão se tornar adultas assintomáticas. Infecções por Salmonelas em aves domésticas são relevantes em saúde pública, por provocarem doenças gastrintestinais em humanos, o que explica o crescente interesse pelo estudo das salmoneloses aviárias (SESTI, 2001; DICKEL, 2004).

Além disso, o Ministério da Agricultura, através da Portaria de número 193 de 19 de setembro de 1994 e também da Instrução Normativa número 70 de 06 de outubro de 2003, estabeleceu respectivamente, a legislação de controle de *Salmonella* nas granjas avícolas, por meio do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e do Programa de Redução de Patógenos em carcaças avícolas. Esses programas visam disponibilizar, nos mercados interno e externo produtos avícolas de qualidade e com controle sanitário contra patógenos específicos como *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* (BRASIL, 1994; BRASIL, 2003).

Por esta razão, a indústria avícola brasileira tem adotado vários critérios para o controle de salmonelas que incluem ações no pré-abate. As ações prévias ao abate objetivam o controle de salmonelas nos plantéis de frangos, pois tem como intuito a redução do número de frangos portadores de *Salmonella* entrando no matadouro (SILVA, 2005).

A introdução de *Salmonella* na cadeia de produção pode ocorrer em diferentes estágios. Um lote contaminado, o ambiente e a ração contaminada são considerados as três maiores fontes de salmonelas de interesse comercial. Muitos pesquisadores atribuem risco significativo de introdução de *Salmonella* por meio de alimentação das aves, sendo a maior exposição dos animais pela ração contaminada (TESSARI et al., 2003).

Desta forma, é importante considerar que a contaminação da ração, nos silos ou comedouros, pode ter um importante papel na propagação do ciclo

de contaminação no lote (BERENDS et al., 1996). Por esta razão, têm-se utilizado produtos como ácidos orgânicos na ração, com a finalidade de se prevenir e controlar infecções por este patógeno.

Entretanto, a eficácia na ação dos ácidos orgânicos é dependente do nível de contaminação das rações, assim como do sorotipo envolvido, sendo que estes fatores devem ser considerados para que haja segurança na adoção deste tipo de tratamento (SILVA, 2006).

Os ácidos orgânicos e os antibióticos têm sido utilizados como aditivos de rações animais para melhorar o desempenho das aves. A acidificação dos alimentos tem potencial para controlar bactérias, como *S. Typhimurium* podendo melhorar o crescimento e a eficiência alimentar, eliminando microrganismos que competem por nutrientes.

Os resultados encontrados na literatura são dependentes da concentração e combinações dos ácidos orgânicos empregados, bem como da capacidade tampão dos ingredientes da ração utilizada. O principal efeito da redução da microbiota se dá no inglúvio e cecos e devido às características anatomo-fisiológicas das aves a estratégia de uso dos ácidos orgânicos é recomendada durante todo o período de produção de frangos de corte (BELLAVER & SCHEUERMANN, 2004).

DIBNER & BUTTIN (2002) afirmaram que os ácidos orgânicos têm papel predominante na redução de microrganismos como *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., se administrados nas rações, levando a consequente redução de infecções subclínicas nas aves. Também contribuem com o aumento da absorção de nutrientes e acentuam as potencialidades do sistema digestivo e imunitário.

Os ácidos orgânicos são classificados na categoria de aditivos químicos e alguns são empregados na alimentação animal. Contêm uma ou mais carboxilas (R-COOH) e são ácidos fracos de cadeia curta, possuindo entre 1 e 7 carbonos que produzem menor quantidade de prótons por molécula, ao se dissociarem. Por estas características, são apontados como agentes com atividade antimicrobiana, no qual o pH do meio desempenha papel relevante (DIBNER & BUTTIN, 2002).

Outros mecanismos de ação são sugeridos por EIDELSBURGER (2001), que atribui à ação dos ácidos orgânicos: capacidade aniónica tamponante

com cátions das dietas (Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++}), aumentando a digestibilidade e retenção desses elementos; utilização da energia do ácidos orgânicos no metabolismo; e também pela diminuição do pH na parte inicial do sistema digestório e conseqüentes efeitos sobre a produção de pepsina e na digestão, bem como pela ação bactericida e bacteriostática na microbiota (bactérias, fungos e leveduras) do sistema digestório. A ação antimicrobiana ocorre porque os ácidos orgânicos diminuem a capacidade de aderência da bactéria à parede intestinal.

Além das alterações no pH intestinal, ativação das enzimas proteolíticas, melhoria na produção de sais biliares, os ácidos orgânicos também podem levar a uma modificação na microbiota gastrintestinal, resultando em maior e melhor absorção de nutrientes e melhor funcionalidade do sistema digestório (GARCIA et al., 2000).

Os ácidos orgânicos podem também apresentar uma forte ação bacteriostática. São absorvidos pelas bactérias, alterando o DNA presente no núcleo da célula e impedindo a multiplicação celular (LANGHOUT, 2000). VAN DEN BROEK (2000) relatou que os ácidos orgânicos podem ter um efeito direto ou indireto sobre as bactérias. O efeito indireto é exercido por aqueles ácidos orgânicos que apenas reduzem o pH da porção inicial do TGI, reduzindo, portanto a população bacteriana. O efeito direto é exercido pelos ácidos orgânicos, que apresentam propriedades extras, além da redução do pH, podendo ser por uma alteração no complexo enzimático intracelular, destruindo a membrana celular e interferindo na duplicação do DNA.

KRABBE (2001) destacou que o uso de ácidos orgânicos já está largamente difundido, especialmente em dietas de pintos, sendo que existem vários tipos utilizados em dietas animais, como o fumárico, fórmico, propiônico, acético e láctico. O autor ainda afirmou que os ácidos orgânicos, quando aplicados na ração, promovem proteção também ao alimento, impedindo o desenvolvimento de microrganismos e formação de toxinas.

É difícil traçar comparativos entre resultados de trabalhos com misturas de ácidos, sem considerar suas diferenças. Benefícios desta ordem dependem dos diferentes tipos de ácidos presentes nas misturas e de suas doses. Entretanto, um número crescente de trabalhos com uso de acidificantes vem

surgindo na literatura, o que permite comparações sobre o conceito do uso desses produtos.

Apesar da grande variedade de trabalhos estudando a ação dos ácidos orgânicos, de acordo com RICKE (2003), o uso adequado desses produtos requer maior entendimento da capacidade e o modo de ação deste produto sobre os diferentes patógenos gastrintestinais.

Diante de tais considerações e da relevância do controle de *Salmonella* na avicultura, o presente trabalho objetivou avaliar a eficácia de uma mistura de ácidos orgânicos (benzóico, fumárico e HMTBa) no controle de *Salmonella* Typhimurium, abordando as variáveis de desempenho, saúde intestinal e hepática das aves tratadas.

REFERÊNCIAS

- 1.BERENDS, B. R.; URLING, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; VAN KNAOPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* sp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 37-53, 1996.
- 2.BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. **Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte.** Palestra apresentada na Conferencia AVISUI 2004. Florianópolis SC, 2004.
- 3.BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola.** Diário Oficial da União. Brasília, Seção 1, p. 14309, em 22/09/1994.
- 4.BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. **Programa de redução de patógenos monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus.** Diário Oficial da União. Brasília, Seção 1, p. 9 em 10/10/2003.
- 5.DIBNER, J.J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v.11, p.453-463, 2002.
- 6.DICKEL, E.L. *Salmonella* em produtos avícolas e aspectos da legislação. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Anais...** Santos: FACTA. p. 201-210, 2004.
- 7.EIDELSBURGER, U. **Feeding short-chain organic acids to pigs.** Nottingham. Nottingham University Press. p.107-121, 2001.
- 8.GARCIA, R. G; ARIKI, J.; MORAES, V. M. B; KRONKA S. N; BORGES, S.A.; MURATA, L.S.; CAMPOS, V.A. Ação isolada ou combinada de ácidos orgânicos e promotor de crescimento em rações de frangos de corte. Campinas, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 2, n. 2, 2000.
- 9.KRABBE, E. L. Alternativas aos promotores de crescimento convencionais Potencial e Viabilidade. In: PRÉ-SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL: AVES E SUÍNOS, 2001, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS. 61-69p, 2001.
- 10.LANGHOUT, P. **Feed Mix – Special: Alternatives to antibiotics**, 2000.
- 11.POPHAL, S.; OETTING, L. **ÁCIDOS ORGÂNICOS: Benefícios na Nutrição Animal.** Novus do Brasil, Novus International Inc, s.d.

- 12.POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J., BRENER, F. W. to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**. v. 149 n. 4, p. 601-604, 1998.
- 13.RAFACZ-LIVINGSTON, K.A.; PARSONS, C.M.; JUNGKT, R.A. The effects of various organic acids on phytate phosphorus utilization in chicks. **Poultry Science**, v.84, p.1356-1362, 2005.
- 14.RICKE.S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, Savoy, v.82, p.632-639, 2003.
- 15.RUNHO, R. C.; SAKOMURA, N. K.; KUANA, S.; BANZATTO, D.; JUNQUEIRA, O. M.; STRINGHINI, J. H. Uso de ácido orgânico nas rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 26, n. 6, p. 1183-1191, 1997.
- 16.SESTI, L. A. C. Filosofias e conceitos de Biossegurança e doenças com potencial de risco para a avicultura brasileira. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, **Anais...Campinas : FACTA**. v. 1, p.47-91, 2001.
- 17.SILVA, E.N. Medidas Gerais de Controle de Salmonelas em Frangos. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2005, Santos (SP). **Anais...Santos: Mendes Convention Center**. p. 229-237, 2005.
- 18.SILVA, P. L. **Segurança alimentar e legislação na produção**. In: VII Simpósio Brasil sul de Avicultura. Chapecó – SC. Embrapa Suínos e Aves. p. 34-40, 2006.
- 19.TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I. Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.
20. VAN DEN BROEK, G. **Feed Mix – Special: Alternatives to antibiotics**, 2000.

CAPÍTULO 2 - Saúde intestinal e desempenho de frangos de corte inoculados com *Salmonella Typhimurium* e tratados com ácidos orgânicos.

RESUMO: O experimento foi conduzido com 630 pintos de um dia de idade com o objetivo de avaliar os efeitos de ácidos orgânicos (ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metiltio-butanóico) frente à inoculação experimental de *Salmonella Typhimurium*, sobre a saúde intestinal e desempenho. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos e sete repetições com 15 pintos cada. O desafio experimental com *Salmonella Typhimurium* ocorreu por duas vias de administração: via inglúvio, ao primeiro dia após eclosão, e via ração durante o período de sete a 14 dias de idade de idade. Estes grupos foram tratados com ácidos orgânicos, definindo-se desta forma, em esquema fatorial de 3x2 (agente versus ácidos). Os tratamentos dos pintos inoculados com a bactéria no primeiro dia de vida receberam via inglúvio a quantidade de $5,0 \times 10^2$ / 0,5mL unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella Typhimurium*. Os tratamentos preconizados com contaminação via ração, receberam a dosagem de $5,0 \times 10^2$ UFC de *Salmonella Typhimurium*/ kg de ração. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Os grupos tratados com ácidos orgânicos apresentaram melhores valores ($p<0,05$) de ganho de peso, peso médio e conversão alimentar aos 14 e 21 dias e de ganho de peso e peso médio ($p<0,05$) aos 28 dias de idade. O peso relativo do intestino delgado foi maior ($p<0,05$) para os grupos inoculados com *Salmonella Typhimurium* quando comparado ao grupo controle, entretanto com comprimento menor ($p<0,05$). O tratamento inoculado via inglúvio e tratado com ácidos apresentou menores valores ($p<0,05$) para contagem de UFC/g para *Escherichia coli*. O pH do conteúdo do conteúdo cecal e intestino delgado não foram afetados ($p>0,05$) pela adição de ácidos orgânicos, enquanto o pH do conteúdo do intestino delgado dos grupos inoculados foi menor ($p<0,05$) quando comparado ao grupo controle durante todo o período experimental. Pode-se concluir que o ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metiltio-butanóico utilizado na dosagem de 0,4% potencializou o desempenho quando da inoculação experimental de *Salmonella Typhimurium*.

Palavras-chave: aves, contaminação, controle, conversão alimentar, salmonelose.

Intestinal health and performance of broilers inoculated with *Salmonella* Typhimurium nalidixic acid-resistant and treated with organic acids.

ABSTRACT: It was conducted an experiment with 630 day old experimentally inoculated with *Salmonella* Typhimurium to evaluate the effects of organic acids blend (benzoic acid, fumaric acid, and 2-hydroxi-metiltio-butanoic acid) on intestinal health and performance. The birds were allotted in completely randomized design with six treatments and seven replications with 15 chicks each. The experimental challenge with *Salmonella* Typhimurium nalidixic acid-resistant, occurred in two different routes of administration: in the crop in the first day after hatch, and in the feed offered from seven to 14 days old. These groups were treated with acid in a factorial arrangement 3x2 (agent *versus* acid). Chicks inoculated with the bacteria in the first day of life received $5.0 \times 10^2 / 0.5$ mL of colony forming units (CFU) of *Salmonella* Typhimurium in the crop. The feed contaminated, were challenged in the concentration of 5.0×10^2 CFU of *Salmonella* Typhimurium / kg feed. The Tukey test (5%) was used to analyse the variables, and the groups treated with acid showed the best values for weight gain, live weight and feed-to-gain ratio ($p < 0.05$) at 14 and 21 days of age and weight gain and live weight at 28 days of age. The small intestine relative weight was higher ($p < 0.05$) for groups inoculated when compared to the control group, although showed less small intestine length. Treatment inoculated in the crop and treated with acid had lower values ($p < 0.05$) for CFU counting of *E.coli*. The pH of the contents of TGI was not affected by the addition of the organic acid, while the pH of the small intestine of inoculated groups was lower ($p < 0.05$) compared to the control group throughout the trial period. It is possible to conclude that the acid used in the dosage of 0.4% improved performance when the *Salmonella* Typhimurium nalidixic acid resistant was experimentally inoculated.

Keywords: birds, contamination, control, feed conversion, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as infecções paratípicas têm sido priorizadas como de alto risco para a produção avícola nacional. Muito deste destaque se relaciona à importância, em saúde pública, atribuída a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium presente nas aves.

O controle da *Salmonella* Typhimurium é essencial, pois esta pode ocasionar restrições ao comércio dos produtos avícolas pelas implicações em saúde pública e ainda provocar grandes prejuízos financeiros devido à mortalidade que pode ocorrer durante as primeiras semanas de idade das aves, ao custo com medicação, à baixa qualidade dos pintos e ao custo com medidas de erradicação e controle (HAFEZ, 2005).

Um dos fatores atribuídos a *Salmonella* está relacionado aos prejuízos à saúde intestinal. E assim como o gênero *Salmonella*, sorotipos patogênicos de *E. coli* podem causar distúrbios em aves. Esses sorotipos aderem ao epitélio intestinal, produzindo enterotoxinas que ocasionam mudanças do fluxo de água e eletrólitos no intestino delgado, resultando em diarréia (ASSIS & SANTOS, 2001). Também podem determinar uma síndrome complexa caracterizada por lesões em múltiplos órgãos determinando: septicemia, perihepatite, pericardite, celulite, problemas respiratórios severos e entéricos (LAMARCHE *et al.*, 2005).

Para promover a melhoria na saúde intestinal e controlar patógenos, os ácidos orgânicos têm sido estudados como um constituinte da dieta animal alternativo aos antibióticos promotores de crescimento. As hipóteses que sustentam o uso dos ácidos orgânicos se relacionam principalmente como potencializador, aumentando a disponibilidade de nutrientes e inibição da proliferação de enterobactérias no sistema digestório das aves (PENZ *et al.*, 1993).

Uma hipótese atribuída à ação dos ácidos orgânicos é o raciocínio de que o pH do meio em que se encontram os microrganismos é um fato importante para o controle de crescimento dos mesmos. Contudo tem sido discutido que o fator mais importante na inibição do crescimento microbiano ocorre através da forma não dissociada dos ácidos orgânicos. Esta forma parece ter maior

capacidade de penetração de membranas plasmáticas por ser molécula de pequeno tamanho e ainda ser hidrofóbica (RODRIGUEZ, 2000).

GAUTHIER (2002) acrescentou que com a dissociação dos ácidos, forma-se um ânion que é altamente polar e, portanto não atravessa facilmente a membrana plasmática dos microrganismos. Enquanto a forma não dissociada pode atravessar a membrana plasmática e no interior da bactéria, o ácido pode dissociar-se e afetar diretamente o pH intracelular de certos microrganismos.

Um importante tipo de ácido orgânico é o fumárico. Ele possui a característica química diferenciada, por ser um pó, o que facilita sua utilização. É um bom bactericida, contudo necessita de elevadas dosagens para ser efetivo (POPHAL & OETTING, s.d.). RUNHO et al. (1997), observaram que à medida que aumentaram o nível de ácido fumárico foi observada melhoria na conversão alimentar de aves durante o período de um a 45 dias de idade. Também RAFACZ-LIVINGSTON et al. (2005) afirmaram que suplementações com ácido fumárico melhoraram o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte.

Assim como o ácido fumárico, o ácido benzóico é um antimicrobiano bastante efetivo, com efeitos muitos positivos a partir da ração. É um ácido que pode atuar na redução da *Salmonella* na ração, graças à suas características de difusão (POPHAL & OETTING, s.d.).

Outro importante acido orgânico é o 2-hidróxi-metiltio-butanóico (HMTBa), uma molécula ativa do suplemento alimentar, que além de ser um precursor de metionina, é também um ácido orgânico. Este composto é o único ácido orgânico conhecido que possui enxofre e que é utilizado como fonte precursora de metionina pelos animais. Sua capacidade antimicrobiana se equipara àquela do ácido fórmico, no que tange a elevada capacidade antimicrobiana, sendo também considerado um ácido potente na redução de pH do TGI (POPHAL & OETTING, s.d.).

Desta forma a inibição da proliferação de bactérias e de outros microrganismos patogênicos ou nocivos, conferida aos acidificantes pode ter influência positiva no ganho produtivo. Ao mesmo tempo é difícil prever as completas interações que pode haver entre os ácidos orgânicos e outros componentes alimentares, assim como a influência destes no metabolismo do

animal e na microbiota saprófita, sendo por esta razão necessários estudos para avaliar a real atuação destes produtos (RODRÍGUEZ, 2000).

Diante da necessidade do controle de patógenos como *E. coli* e *Salmonella Typhimurium* o presente estudo foi elaborado e desenvolvido, com o intuito de verificar a ação de uma mistura de ácidos orgânicos até então não testada em aves sobre os parâmetros de desempenho e sobre a saúde intestinal em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium*

MATERIAL E MÉTODOS

Aves e Instalações

O experimento foi realizado durante o período de janeiro a fevereiro de 2008 e desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e no Laboratório de Bacteriologia da Escola de Veterinária da UFG.

Manejo Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e em esquema fatorial 3x2 avaliando os agentes inoculados (solução salina a 0,85%, *S. Typhimurium* via inglúvio ou ração) e uso de ácidos orgânicos - 4 kg/Tonelada (com e sem). Totalizando seis tratamentos, com sete repetições e 15 aves por unidade experimental. Foram utilizados 630 pintos de um dia distribuídos conforme mostrado no Quadro 1 e alojadas por 28 dias.

Quadro 1 - Delineamento experimental detalhando os seis tratamentos.

TRATAMENTOS	Desafio <i>S. Typhimurium</i>	Ácidos orgânicos	Nº de aves
T1	Sim (1ºdia de idade) - Via inglúvio	Sim	105
T2	Sim (1ºdia de idade) - Via inglúvio	Não	105
T3	Sim (7º-14º dia de idade) - Ração	Sim	105
T4	Sim (7º-14º dia de idade) - Ração	Não	105
T5	Não - Solução salina a 0,85%	Sim	105
T6	Não - Solução salina a 0,85%	Não	105

O inóculo foi preparado com *Salmonella Typhimurium* isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida por REZENDE (2002). Para obtenção do inóculo a cepa foi repicada em ágar verde brilhante e incubada a 37°C, por 18-20h. Por passagens sucessivas em meios de cultura, a cepa se tornou ácido nalidíxico resistente. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantidas a 4°C e a concentração de $5,0 \times 10^2$

UFC/0,5mL ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001). Sendo então confirmada pelo plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37⁰C e contagem das UFC de *Salmonella*.

Os pintos dos tratamentos preconizados para inoculação da bactéria ao primeiro dia de vida receberam via inglúvio a dosagem de 5,0 x 10² UFC de *Salmonella Typhimurium*. Os tratamentos controle não receberam a bactéria.

Os tratamentos preconizados com contaminação via ração, receberam o desafio durante o período de sete a 14 dias após eclosão com a bactéria na concentração de 5,0 x 10² UFC de *Salmonella Typhimurium/ kg* de ração, de acordo com REZENDE (2006). Os pintos do tratamento controle foram alojados em ambientes diferentes dos contaminados, com o intuito de evitar contaminação cruzada, porém mantendo similar ambiência e igual manejo.

Manejo alimentar

As rações fornecidas aos animais, farelada a base de milho moído e farelo de soja, sem antibióticos promotores de crescimento e anticoccidianos, foram formuladas de acordo com a composição e exigências nutricionais propostas por ROSTAGNO et al. (2005). Todas as aves receberam ração e água “ad libitum”.

O composto de ácidos orgânicos benzóico (22,44%), fumárico (41,34%) e HMTBa (28,40%) foi fornecido as aves de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante, sendo administrado na ração durante todo o período experimental, na dosagem de 0,4%. Todos os tratamentos durante a mesma faixa etária receberam o mesmo nível de energia e proteína. As rações pré-inicial, inicial e de crescimento forneceram respectivamente, 2.950, 3.000 e 3.100 de energia metabolizável (kcal/kcal de ração) e 22 %, 20,97% e 19,41% de proteína bruta.

Variáveis estudadas

Desempenho produtivo

As pesagens regulares das aves e da ração foram feitas com um, sete, 14, 21 e 28 dias de idade para cálculo de consumo de ração, ganho de peso e de conversão alimentar. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre os pesos médios das aves, dentro de cada período. O consumo de ração foi obtido pela diferença entre os valores de ração fornecida e a sobra dentro da faixa etária. E o índice de conversão alimentar foi calculado pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso corrigido pelo peso das aves mortas. Paralelamente, o consumo de água foi medido diariamente até 28 dias de idade das aves.

Avaliação intestinal

Nos dias sete, 14, 21 e 28, as aves foram submetidas a jejum alimentar de duas a três horas antes do início da necropsia para eliminação de conteúdo do trato digestório. Uma ave por parcela foi necropsiada, sendo o peso e o comprimento do intestino delgado anotados, realizando-se o cálculo relativo ao peso da ave, de acordo com GRIEVES (1991).

Paralelamente, no 14º e 21º dias, amostras da porção final do intestino grosso foram colhidas de cada ave do T1, T2, T5 e T6 para contagem de *Escherichia coli*.

Para realização desta contagem, foram pesados 0,5 gramas da porção final do intestino grosso de uma ave por parcela, sendo então transferidos para tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina tamponada a 0,1%. A partir desta diluição inicial com auxílio de pipetas automáticas, foram feitas diluições seriadas até 10^{-4} e 10^{-6} e 0,1 mL destas duas diluições foram transferidas para placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno (EMB), fazendo-se o plaqueamento em superfície. As colônias típicas e atípicas, segundo BRASIL (2003), foram repicadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e os isolados do TSI foram confirmados para presença de *E. coli* pela bioquímica através da produção de indol e vermelho de metila, ausência de motilidade, produção de H₂S, urease e reação no citrato de Simmons.

Avaliação de pH intestinal

Aos sete, 21 e 28 dias o conteúdo do intestino delgado e do ceco de uma ave por parcela, foi também coletado e os valores de pH destas porções foram mensurados. Para determinar o pH o conteúdo do duodeno e do ceco foram colocados em frascos contendo 15mL de água destilada, sendo homogeneizados e logo após feita a determinação do pH, segundo a metodologia empregada por SILVA et al. (2000).

Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas quando observada diferença pelo teste de Tukey a 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se (Tabela 1) que a inoculação de *Salmonella Typhimurium* influenciou ($p<0,05$) o consumo de ração e a conversão alimentar aos sete dias, sendo que aqueles que foram inoculados com a bactéria via inglúvio apresentaram maior consumo de ração e pior conversão alimentar quando comparados com o grupo que recebeu apenas placebo.

TABELA 1 – Peso inicial (PI), peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) durante o período de um a sete dias de idade de frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	PI	PM	GP	CR	CA
Ácidos orgânicos (A)					
Sem	42,79	181,03	138,04	142,06	1,030
Com	42,33	177,24	134,93	139,76	1,035
Agentes inoculados (S)					
Placebo	42,68	178,52	135,84	132,80B	0,977A
ST- Inglúvio*	42,62	179,75	137,14	149,02A	1,087B
ST- Ração*	42,37	-	-	-	-
Fator de Variação (%)					
Ácidos orgânicos	< 0,01	NS	NS	NS	NS
Agentes inoculados	< 0,01	NS	NS	< 0,01	< 0,01
A x S	< 0,01	NS	NS	NS	NS
C.V. (%)	0,39	4,77	6,24	8,89	5,93

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%. * ST-Inglúvio (*Salmonella Typhimurium* inoculado via inglúvio), * ST-Ração (*Salmonella Typhimurium* inoculado via Ração).

Esses dados mostraram que a colonização do sistema digestório na primeira semana resultou em modificações logo nos primeiros dias de vida sobre o consumo de ração e conversão alimentar ($p<0,05$). Além de ser observada diminuição de ganho de peso e pior conversão alimentar, ainda se tem o risco de transmissão do patógeno ao homem pela eliminação da bactéria pelas excretas. Para DICKEL (2004) e JUNIOR & OLIVEIRA (2006), as salmonelas paratípicas causam infecção principalmente em pintos que poderão se tornar aves assintomáticas com a persistência no intestino destas, possibilitando a eventual contaminação das carcaças.

A adição de ácidos orgânicos não influenciou ($p>0,05$) os parâmetros de desempenho aos sete dias (Tabela 1). Também em estudo conduzido por VIOLA & VIEIRA (2007) não foi observada em consequência da utilização de ácidos orgânicos sobre estas variáveis. Porém propõe-se que a inclusão de acidificantes em dietas na fase inicial pode ser determinante nas respostas de desempenho nas fases posteriores (DASKIRAN et al., 2004).

A diferença no peso inicial visualizada na Tabela 1 é justificada pelo baixo coeficiente de variação, sendo que desta forma, quando ocorreu um mínimo desvio, o teste foi capaz de detectar diferença.

Da mesma forma que aos sete dias (Tabela 2), os animais que foram inoculados com *Salmonella*, apresentaram maior ($p<0,05$) consumo de ração e pior ($p<0,05$) conversão alimentar que o grupo com placebo. Durante o mesmo período, ocorreu diferença ($p<0,05$) quando da adição de ácidos orgânicos, com efeito positivo sobre a conversão alimentar, ou seja, o grupo que recebeu o produto apresentou melhor conversão alimentar que o seu grupo controle.

TABELA 2 – Peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) durante o período de um a quatorze dias de idade de frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	PM	GP	CR	CA
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	431,02	388,23	490,38	1,303B
Com	455,68	413,53	484,70	1,179A
Agentes inoculados (S)				
Placebo	455,14	402,45	402,49B	1,012A
ST- Inglúvio *	426,80	384,18	521,16A	1,414B
ST- Ração *	458,11	415,74	538,98A	1,297B
Fator de variação (%)				
Ácidos orgânicos	0,03	0,03	NS	0,03
Agentes inoculados	NS	NS	<0,01	<0,01
A x S	0,03	0,03	NS	NS
C.V. (%)	8,09	8,96	3,99	14,18

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%. * ST-Inglúvio (*Salmonella Typhimurium* inoculado via inglúvio) e * ST-Ração (*Salmonella Typhimurium* inoculado via Ração).

Esses resultados encontram respaldo em (PARTANEN & MROZ, 1999) quando afirmaram que os ácidos orgânicos se utilizados corretamente junto com medidas nutricionais, de manejo e biosseguridade, podem ser uma ferramenta poderosa para manter a saúde do trato intestinal das aves, influenciando a conversão alimentar.

Uma mistura de ácidos fumárico (0,5%), láctico (5,1%), cítrico (5,4%) e ascórbico (1,2%) utilizada por MAIORKA et al. (2002) nas fases pre-inicial e inicial de frangos na proporção de 0,05% da dieta, proporcionou melhoria na conversão alimentar somente até os sete dias de idade pelo uso de ácidos orgânicos.

Ao avaliar a interação entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos (Tabela 3) nota-se que as aves inoculadas com a bactéria via inglúvio apresentaram melhores valores de peso médio e de ganho de peso aos 14 dias de idade, quando receberam os ácidos.

TABELA 3 – Desdobramento das interações significativas entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos para as variáveis de peso médio e ganho de peso, aos 14 dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	Peso médio 14 dias		
	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Ácidos orgânicos			
Sem	441,02Aab	393,44Bb	458,60Aa
Com	449,26Aa	460,16Aa	457,62Aa

	Ganho de peso 14 dias		
	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Ácidos orgânicos			
Sem	397,98Aab	350,49Bb	416,21Aa
Com	402,92Aa	417,87Aa	415,27Aa

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Estes resultados mostram que provavelmente os ácidos orgânicos, que estão na sua forma não dissociada, penetraram na parede celular da bactéria e na célula bacteriana se dissociaram liberando o cátion (+) e o ânion (-). A forma catiônica reduziu o pH interno, as bactérias consumiram energia para manter o

equilíbrio, morreram e desta forma, o ácidos orgânicos exerceu função bactericida. Já o ânion se difundiu livremente através da parede celular, em sua forma não dissociada, e a acumulação deste tornou-se tóxica para a bactéria conduzindo a problemas osmóticos internos, interferindo na síntese protéica da bactéria (LAMBERT & STRATFORD, 1999). Também LE NY (2005), relatou que os ácidos orgânicos têm primordialmente dois modos de ação: inibir a permanência de patógenos através da diminuição de pH intracelular e interferência na síntese de DNA pela interrupção da síntese protéica.

Observa-se também (Tabela 3), que o grupo inoculado no inglúvio com *Salmonella Typhimurium* apresentou ($p<0,05$) menor peso médio e pior ganho de peso aos 14 dias que o grupo que foi desafiado via ração contaminada. Esse resultado pode ser explicado pela idade em que frangos foram inoculados via ração (sete dias).

Esse dado é justificado pela afirmativa que na primeira semana experimental, o intestino já está sendo colonizado pelas bactérias oriundas da câmara de eclosão, forro da caixa de transporte ou ambiente de criação. Desta maneira a microbiota intestinal é estabelecida e o concomitante desenvolvimento do sistema imune provavelmente contribuiu para obtenção deste resultado, durante o período experimental. Isto indica que com o avançar da idade os mecanismos de defesa específicos são capazes de suprimir infecções por *Salmonella*, fato atribuído ao desenvolvimento do sistema imune celular e humorai, durante as primeiras semanas da vida (DESMIDT et al., 1997).

Esse mecanismo é confirmado por BARROW (2000), quando afirmou que a capacidade de invasão da *Salmonella* é dependente da idade da ave e da porta de entrada do agente. Também BEAL et al. (2004b), desafiaram, via oral, aves na primeira, terceira e sexta semana de vida com 10^8 UFC de *Salmonella Typhimurium* e demonstraram que a persistência da infecção foi menor e o desenvolvimento da imunidade foi mais efetivo nas aves desafiadas mais velhas.

Da mesma forma que aos 14 dias, durante o período de um a 21 dias (Tabela 4), verifica-se que a conversão alimentar foi ($p<0,05$) melhor para o grupo que recebeu ácidos orgânicos quando comparado ao que não recebeu. É possível supor que houve redução do desafio microbiológico pela ação antimicrobiana dos acidificantes, porém, também não podem ser descartados outros benefícios pela

ativação enzimática em nível intestinal e nutrição celular. De acordo com EIDELSBURGER (2001), os ácidos orgânicos podem ainda pela sua capacidade aniônica tamponante, se ligar a cátions das dietas (Ca++, Mg++, Fe++, Cu++, Zn++), aumentando a digestibilidade e absorção de nutrientes, melhorando desta forma o desempenho.

TABELA 4 – Peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) durante o período de um a 21 dias de idade em frangos de corte inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	PM	GP	CR	CA
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	797,92	755,13	962,36	1,333B
Com	854,33	812,01	1008,06	1,298A
Agentes inoculados (S)				
Placebo	778,07	735,39	860,97	1,231A
ST- Inglúvio	853,82	811,21	1028,84	1,341B
ST- Ração	846,48	804,11	1065,82	1,374B
Fator de variação (%)				
Ácidos orgânicos	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Agentes inoculados	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
A x S	< 0,01	< 0,01	< 0,01	NS
C.V. (%)	4,33	4,56	3,83	3,21

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Um dos ácidos utilizados no presente estudo foi o fumárico. RAFACZ-LIVINGSTON et al. (2005 a, b) afirmaram que suplementações com esse ácidos orgânicos melhoraram o ganho de peso e a conversão alimentar, de frangos de corte. Também GARCIA et al. (2000), abordando a utilização de ácidos orgânicos em frangos de corte (0,1%) até o 21º de idade, verificaram uma melhoria de 2,1% no ganho de peso e 4,3% na conversão alimentar, com a utilização do produto. Da mesma forma, MAIORKA et al. (2004) verificaram que a presença de ácidos orgânicos fumárico, lático, cítrico e ascórbico melhorou significativamente a conversão alimentar das aves, aos 21 dias de vida. VIOLA et al. (2008), avaliando o efeito da inclusão de diferentes misturas de ácidos orgânicos observaram que houve um benefício geral do uso das misturas sobre o ganho de peso corporal, no período total.

Foi possível observar também (Tabela 4) que independente da via, os dois grupos inoculados com o patógeno demonstraram pior ($p<0,05$) conversão alimentar, quando estes são comparados ao grupo que recebeu somente placebo.

Segundo BEAL et al. (2004a) e SADEYEN et al. (2004), a infecção por *S. Typhimurium* pode gerar alta mortalidade em aves no primeiro dia ou promover longa persistência no sistema digestório de aves, sem demonstração de sinais clínicos. *Salmonella* pode ser excretada e por transmissão horizontal contaminar outras aves bem como a carcaça após abate.

A intensidade e duração da colonização bacteriana são atribuídas à imunidade do hospedeiro, (BERTHELOT et al., 1998) à idade da ave, a via de inoculação e do sorotipo em questão (LAMONT et al., 2002; BEAUMONT et al., 2003). A colonização do intestino é estabilizada dentro dos cecos, representando um reservatório de infecção de salmonela em aves e podendo levar a perdas no desempenho.

Ao avaliar a interação entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos sobre o peso médio e ganho de peso (Tabela 5) aos 21 dias de idade, nota-se que tanto as aves inoculadas com placebo quanto as com a bactéria, via inglúvio, quando receberam os ácidos orgânicos obtiveram maiores valores ($p<0,05$) no peso médio e ganho de peso que seus respectivos grupos sem ácidos.

TABELA 5 – Desdobramento das interações significativas entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos para as variáveis de peso médio e ganho de peso aos 21 dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

Peso médio 21 dias			
Ácidos orgânicos	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Sem	732,23Bb	810,86Ba	850,68Aa
Com	823,92Ab	896,79Aa	842,29Aab
Ganho de peso 21 DIAS			
Ácidos orgânicos	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Sem	689,19Bb	767,91Ba	808,29Aa
Com	781,59Ab	854,50Aa	799,93Aab

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Esses resultados encontram respaldo nos estudos de MAIORKA et al. (2004) que verificaram melhor conversão alimentar com a utilização de mistura de ácidos orgânicos durante o período de um a 21 dias de idade das aves. Também CORNELI (2004) concluiu que a adição de ácidos orgânicos durante o período de 22 a 35 dias de idade apresentou efeito significativo, onde as aves que receberam acidificantes obtiveram melhor conversão alimentar quando comparada com os outros tratamentos. Da mesma forma, VIOLA & VIEIRA (2007) observaram que a suplementação de misturas de acidificantes em dietas para frangos de corte produziu benefícios no desempenho zootécnico.

Verifica-se também que (Tabela 5) dentre os grupos que receberam os ácidos, o grupo com placebo obteve menor peso ($p<0,05$) quando comparado ao grupo inoculado no inglúvio com a *Salmonella Typhimurium*. Além disso, dos três grupos que não receberam os ácidos, os grupos inoculados no inglúvio e na ração apresentaram ($p<0,05$) maior peso médio e ganho de peso que o grupo que recebeu placebo. Esse resultado pode ser resultante do maior consumo de ração ($p<0,05$), durante este mesmo período para o grupo inoculado quando comparado ao grupo placebo, já que a conversão alimentar foi pior quando comparada ao grupo com placebo.

Além disso, o fato dos grupos inoculados com *Salmonella Typhimurium* terem apresentado melhor desempenho que o controle pode também ser justificado pelas considerações de DOWLING (1992) e FURLAN et al. (2004). Esses autores afirmaram que após perda de grandes áreas na mucosa intestinal, responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes, pela ação de agentes patogênicos, o epitélio remanescente torna-se hiperplásico com maior altura de vilo e de profundidade de cripta. A produção de células na cripta aumenta e o mesmo ocorre com o número de células que compõem o vilo. Assim, como resultado do aumento da mucosa intestinal, o intestino como um todo apresenta maior capacidade de absorção de nutrientes e eletrólitos.

Analizando-se o desdobramento da interação entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos sobre o consumo de ração (Tabela 6) aos 21 dias, nota-se que somente as aves inoculadas pelo inglúvio, quando receberam os ácidos orgânicos, obtiveram maiores valores ($p<0,05$) para consumo de ração que o respectivo grupo sem ácidos. Observa-se também que dentre os grupos que

receberam ácidos orgânicos, o que recebeu placebo consumiu menos ração, quando comparado com os grupos inoculados com *Salmonella* independente da via. Além disso, nos grupos que não receberam o ácido, todos diferiram entre si, sendo que o grupo inoculado na ração obteve maior ($p<0,05$) consumo de ração, seguido do inoculado via inglúvio.

Com estes resultados pode-se inferir que os ácidos orgânicos não afetaram significativamente o consumo de ração das aves, mostrando que não foi tóxico para as mesmas e contrariando os achados de RUNHO (1997) que observou depressão no consumo de ração das aves com a adição nas rações de ácido fumárico a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%. Desta forma, a diferença encontrada não pode ser atribuída à percentagem de ácido utilizada.

TABELA 6 – Desdobramento das interações significativas entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos para a variável consumo de ração aos vinte um dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

Ácido orgânicos	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Sem	836,97Ac	982,87Bb	1067,24Aa
Com	884,97Aa	1074,81Ab	1064,41Ab

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Na Tabela 7 estão demonstrados os dados de desempenho de um a 28 dias de vida. Os animais que receberam *Salmonella*, independente da via, mostraram maiores ($p<0,05$) valores no consumo de ração e consequente pior ($p<0,05$) conversão alimentar que o grupo com placebo.

TABELA 7 – Peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) durante o período de um a 28 dias de idade em frangos de corte inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos

	PM	GP	CR	CA
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	1125,10B	1082,31B	1513,90	1,534
Com	1201,13A	1158,80A	1574,46	1,505
Agentes inoculados (S)				
Placebo	1155,16	1112,48	1406,75B	1,398A
ST- Inglúvio	1170,25	1127,63	1599,55A	1,565B
ST- Ração	1163,92	1121,55	1626,25A	1,596B
Fator de Variação (%)				
Ácidos orgânicos	< 0,01	< 0,01	NS	NS
Agentes inoculados	NS	NS	< 0,01	< 0,01
A x S	NS	NS	NS	NS
C.V. (%)	5,97	6,20	6,79	4,60

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Sabe-se que as aves infectadas podem excretar *Salmonella* por um longo período sem que apresentem sinais clínicos, porém gerando prejuízos econômicos como perdas no ganho e peso, maior consumo de ração e pior conversão alimentar (DELAZARI, 2001; LEITÃO, 2001). A pior conversão alimentar ($p<0,05$) observada foi também confirmada por XIE et al. (2000), quando verificaram uma significativa redução no desempenho de frangos de corte inoculados com Lipopolissacárido (LPS) de *Salmonella Typhimurium*.

Pode-se observar também (Tabela 7) que ocorreu diferença ($p<0,05$) quando da adição de ácidos orgânicos, com efeito positivo sobre o peso médio e ganho de peso durante o período experimental de um a 28 dias. Relatam que os ácidos orgânicos reduzem a colonização por *Salmonella* (VAN IMMERSEEL et al., 2004) e promovem melhoria no desempenho e na utilização de fósforo da dieta (SNOW et al., 2004; RAFACZ-LIVINGSTON et al., 2005 a e b).

SKINNER et al (1991) encontraram efeito positivo do ácido fumárico utilizando continuamente a concentração de 0,125% até os 49 dias, havendo redução linear da mortalidade em um dos experimentos com o uso até 0,50% na dieta. Também VIOLA & VIEIRA (2007) com objetivo de testar o efeito da inclusão de diferentes misturas de ácidos orgânicos nas dietas, verificaram que o ganho de peso corporal não foi afetado pelos tratamentos durante os períodos avaliados,

sendo que somente no final do experimento, foi observada melhor conversão alimentar para as aves consumindo acidificantes em relação às do grupo controle negativo. Por sua vez, WALDROUP et al. (1991), promovendo um desafio oral com *S. Typhimurium* e utilizando níveis crescentes de até 2% de ácido fumárico verificaram que o produto não foi eficaz na inibição da colonização cecal dos animais.

Durante todo período experimental, o consumo de água foi medido diariamente. Nota-se na Tabela 8, que os ácidos orgânicos não influenciaram significativamente na proporção entre o consumo médio de água e o consumo de ração.

TABELA 8 – Relação entre o consumo médio de água e o consumo de ração corte aos sete, 14, 21 e 28 dias em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	3,24	2,38	2,51	2,76
Com	3,39	2,42	2,49	2,81
Agentes inoculados (S)				
Placebo	3,01	2,97A	2,89A	3,14A
ST- Inglúvio	3,25	2,11B	2,29B	2,58B
ST- Ração	-	2,14B	2,31B	2,63B
Fator de Variação (%)				
Ácidos orgânicos	NS	NS	NS	NS
Agentes inoculados	NS	<0,01	< 0,01	< 0,01
A x S	NS	NS	NS	NS
C.V.	9,47	5,33	6,96	6,64

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Também VIOLA & VIEIRA (2007), quando testaram o efeito da inclusão de diferentes misturas de ácidos orgânicos nas dietas, não verificaram nenhuma diferença no consumo de água. Por sua vez, BYRD et al. (2001) verificaram que uma mistura de ácidos orgânicos reduziu o consumo de água quando comparado ao grupo controle.

Porém, aos 14, 21 e 28 dias de idade (Tabela 8) foram observadas diferenças ($p<0,05$), onde a relação entre consumo de água e consumo de ração foi maior para o grupo que recebeu placebo quando comparados aos grupos inoculados com *S. Typhimurium* independente da via. Esse resultado é atribuído

ao maior consumo de ração durante os períodos avaliados, resultando em um menor valor desta variável.

Aos sete, 14, 21 e 28 dias, uma ave por parcela foi escolhida ao acaso com o intuito de promover a análise biométrica dos órgãos em relação ao peso da ave. E das mesmas o intestino delgado foi colhido, pesado e medido (Tabelas 9 a 11).

Nota-se na Tabela 9, que aos 21 dias o peso relativo do intestino delgado foi menor ($p<0,05$) quando da adição de ácidos orgânicos. Observa-se também, que esta variável foi maior ($p<0,05$) aos sete, 21 e 28 dias para os tratamentos inoculados com *Salmonella*, independente da via de administração, quando comparada com o grupo com placebo. Uma explicação é que o consumo de ração foi maior ($p<0,05$) para os grupos inoculados aos sete, 21 e 28 dias, o que pode ter ocasionado maior peso do intestino delgado. Porém a conversão alimentar foi pior ($p<0,05$) para o grupo inoculado durante os mesmos períodos. Desta maneira, o maior peso desta porção intestinal sugere não estar relacionado a uma melhor saúde intestinal ou absorção intestinal.

TABELA 9 – Peso relativo (g) do intestino delgado de frangos de corte aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade de frangos de corte inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	7,37	4,98	4,41A	3,42
Com	7,07	4,71	3,77B	3,41
Agentes inoculados				
Placebo	6,29B	4,33	3,06B	2,40B
ST- Inglúvio	8,16A	4,88	4,73A	3,86A
ST- Ração	-	5,33	4,48A	3,98A
Fator de Variação (%)				
Ácidos orgânicos	NS	NS	0,02	NS
Agentes inoculados	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
A x S	NS	<0,01	NS	NS
C.V. (%)	9,61	11,82	22,51	12,69

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Outra causa para esse achado pode ser atribuída à ação da *Salmonella* e provavelmente resultante de um processo inflamatório no intestino,

pois desafios microbiológicos podem gerar inflamação intestinal e algumas vezes necrose dos tecidos intestinais (APAJALAHTI, 2005).

Analizando-se o desdobramento da interação entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos sobre o peso do intestino delgado aos 14 dias (Tabela 10), verifica-se que somente o grupo de aves inoculadas na ração e que receberam os ácidos orgânicos obtiveram valores menores ($p<0,05$) no peso no intestino delgado que o respectivo grupo sem ácidos orgânicos. Este resultado sugere que o grupo inoculado via ração apesar de sofrer a infecção, a utilização de ácidos orgânicos levou a redução do processo infeccioso.

TABELA 10 – Desdobramento das interações significativas entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos para variável peso do intestino delgado (g) aos 14 dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Ácidos orgânicos			
Sem	4,43Ab	4,63Ab	5,89Aa
Com	4,23Aa	5,13Aa	4,76Ba

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Por sua vez, VIOLA et al. (2008), desenvolvendo experimento com vários ácidos, observaram que aos sete dias de idade, o peso relativo do intestino delgado e o comprimento do órgão, no grupo controle, foi inferior ao daqueles que receberam misturas de ácidos.

Observa-se também (Tabela 10) que dentre os grupos que não receberam ácidos orgânicos, o que foi inoculado via ração demonstrou maior peso do intestino delgado, quando comparado com os grupos inoculados com placebo ou com *Salmonella* via inglúvio. Estes fatos podem ser justificados pelo período de inoculação via ração (7º ao 14º dia) de idade, pois aos 14 dias, a infecção estava mais recente neste último grupo e o processo inflamatório mais acentuado, refletindo no maior peso.

APAJALAHTI (2005) afirmou que a presença de microrganismos no sistema digestório eleva potencialmente a competição por nutrientes, acelera a

passagem do alimento, aumenta a descamação de células intestinais e estimula a secreção de mucina pelas células caliciformes desencadeando processos inflamatórios.

Nota-se na Tabela 11, que aos sete e 14 dias o grupo inoculado com placebo apresentou maior comprimento de intestino delgado ($p<0,05$) que os grupos inoculados com *Salmonella Typhimurium*, independente da via. Este achado encontra respaldo com o resultado observado, para peso do intestino delgado nestas mesmas faixas etárias. O peso deste fragmento intestinal foi maior para o grupo inoculado, o que indica um processo inflamatório que resultou no menor desenvolvimento do órgão com menor comprimento, levando provavelmente a menor área de absorção, com consequente pior ($p<0,05$) conversão alimentar aos sete e quatorze dias de idade para o grupo inoculado.

TABELA 11 – Comprimento relativo (cm) do intestino delgado aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	51,12	21,91	16,64	11,87
Com	50,91	22,20	16,55	11,00
Agentes inoculados				
Placebo	54,22A	24,32A	16,04	11,54
ST- Inglúvio	47,81B	20,90B	16,51	11,68
ST- Ração	-	20,95B	17,23	11,10
Fator de Variação (%)				
Ácidos orgânicos	NS	NS	NS	NS
Agentes inoculados	<0,01	<0,01	NS	NS
A x S	NS	NS	NS	NS
C.V. (%)	12,44	10,58	26,89	11,23

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Paralelamente a medição e pesagem do intestino delgado, 0,5 g de excretas foram coletadas da porção final do reto aos 14 e 21 dias de idade com a finalidade de enumeração (UFC/g) de *Escherichia coli*. Os resultados destes valores estão dispostos nas Tabelas 12 e 13.

TABELA 12 – Contagem de *Escherichia coli* (UFC/g) na porção final do intestino grosso aos 14 e 21 dias de idade (expressa em Log) em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	14 dias	21 dias
Ácidos orgânicos (A)		
Sem	6,14	6,74
Com	6,11	6,21
Agentes inoculados (S)		
Placebo	6,35	7,03
ST- Inglúvio	5,90	5,91
Fator de Variação (%)		
Ácidos orgânicos	NS	NS
Agentes inoculados	NS	<0,01
A x S	NS	0,04
C.V. (%)	13,51	11,48

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Nota-se na Tabela 13, que dentre os tratamentos que receberam os ácidos orgânicos, o grupo inoculado no inglúvio, com *Salmonella Typhimurium*, foi o que apresentou menor ($p<0,05$) valor na contagem de UFC de *E. coli*.

TABELA 13 - Desdobramento das interações significativas entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos para valores de contagem de *E. coli* aos 21 dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	Agentes inoculados	
	Placebo	ST- Inglúvio
Ácidos orgânicos		
Sem	6,99	6,48 B
Com	7,07 b	5,35 Aa

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Como se sabe essa bactéria faz parte da microbiota entérica normal de mamíferos e aves (CARDOSO et. al., 2002). O que provavelmente aconteceu com a inoculação de *Salmonella* durante o período experimental, foi competição por local de atuação no intestino e consequente diminuição na contagem em UFC/g de *E. coli*. Esta suposição foi abordada por MACHADO (2000), quando afirmou que a persistência e manutenção das bactérias no trato intestinal ocorrem através de dois mecanismos principais: fixação ou íntima associação com o

epitélio intestinal ou podem se encontrar livres na luz intestinal pela sua incapacidade de aderir no epitélio. Desta maneira, a competição por local de atuação pode ter sido a causa do decréscimo nas UFC de *E. coli*.

Também foi verificado (Tabela 13) que o grupo inoculado com *S. Typhimurium* via inglúvio, quando recebeu ácidos orgânicos demonstrou menores valores na enumeração de *E. coli* que seu respectivo grupo sem ácidos orgânicos.

Os ácidos orgânicos possuem atividade antimicrobiana, além de outros benefícios e vêm demonstrando resultados positivos na saúde e desempenho de aves. Estes resultados são potencializados com a utilização de *blends* de ácidos orgânicos quando comparados à utilização de um único ácido. Além dos benefícios à saúde animal, propicia também alimentos mais seguros, pois reduz a contaminação de carcaça por bactérias, como *E. coli* (POPHAL & OETTING, s.d.). Em experimento realizado por IZAT et al. (1990), a adição de níveis crescentes de ácidos orgânicos resultou em diminuição da colonização de *E. coli* no intestino delgado. Alguns autores afirmam também que suplementação com ácidos orgânicos orgânico pode reduzir a proliferação de bactérias patogênicas, como *E. coli*, no sistema digestório (RICHARDS et al., 2005).

Um dos principais efeitos benéficos da utilização de ácidos orgânicos nas dietas está relacionado com a seleção da microbiota benéfica no início da vida dos animais. Auxiliando o mecanismo de exclusão competitiva e o estabelecimento de microrganismos desejáveis no intestino. KLUGE et al. (2006), afirmaram que os ácidos orgânicos reduzem principalmente o número de bactérias patogênicas e afetam o balanço da microbiota do intestino. Também LI et al. (2008), com intuito de verificar a ação dos ácidos fumárico, benzólico e HMTBa sobre a microbiota intestinal verificou uma tendência à diminuição de *E. coli* quando comparada com o grupo controle.

Aos sete, 21 e 28 dias o conteúdo do intestino delgado e do ceco foram também coletados e os valores de pH destas porções foram aferidos. Verifica-se na Tabela 14 que a adição de ácidos orgânicos não interferiu no pH destas porções do intestino ($p>0,05$) nos períodos estudados.

Esses achados condizem com o mecanismo de ação dos ácidos estudados, já que o efeito antibacteriano deste produto tem efeito maior na parte anterior do sistema digestório (inglúvio/ moela), sendo que da mesma forma,

THOMPSON & HINTON (1997) mostraram que houve atuação de ácidos principalmente no inglúvio e moela, mostrando maior ação nesses compartimentos. Além disso, BELLAVER & SCHEUERMANN (2004) mostraram que ácidos usados no nível de 2,5% na forma de sais de cálcio, foram completamente digeridos antes do divertículo de Meckel. LI et al. (2008) não encontraram diferenças significativas nos valores pH dos diferentes segmentos do intestino delgado utilizando 0,5% e 1% de associação de ácido benzóico, fumárico e HMTBa.

TABELA 14 – Valores de pH do conteúdo cecal e das porções do intestino delgado aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	7 dias	21 dias	28 dias
Ácidos orgânicos (A)			
Sem	6,67	6,44	6,24
Com	6,37	6,51	6,05
Agentes inoculados (S)			
Placebo	6,82A	6,70A	6,88A
ST- Inglúvio	6,22B	6,24B	5,86B
ST- Ração	-	6,33B	5,70B
Fator de Variação (%)			
Ácidos orgânicos	NS	NS	NS
Agentes inoculados	<0,01	<0,01	<0,01
A x S	NS	NS	NS
C.V. (%)	7,25	5,76	7,22
pH CECO			
	7 dias	21 dias	28 dias
Ácidos orgânicos (A)			
Sem	6,59	6,68	6,65
Com	6,61	6,53	6,82
Agentes inoculados (S)			
Placebo	7,15A	6,68	6,89
ST- Inglúvio	6,04B	6,45	6,63
ST- Ração	-	6,69	6,68
Fator de Variação (%)			
Ácidos orgânicos	NS	NS	NS
Agentes inoculados	< 0,01	NS	NS
A x S	NS	<0,01	NS
C.V.	8,94	4,98	4,89

Letras diferentes na mesma coluna e em mesma faixa etária indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Verificou-se também (Tabela 14) que o pH do intestino delgado foi significativo maior para o grupo placebo quando comparado com o grupo inoculado com *S. Typhimurium* nos períodos analisados. Em relação ao pH do ceco observou-se diferença significativa aos sete dias de vida (Tabela 14) e aos 21 dias (Tabela 15), também com maiores valores para o grupo com placebo.

TABELA 15 - Desdobramento das interações significativas entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos para variável peso do intestino delgado aos vinte um dias de idade em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Ácidos orgânicos			
Sem	6,53Aa	6,70Aa	6,81Aa
Com	6,83Aa	6,21Ab	6,56Aab

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Provavelmente *S. Typhimurium* determinou maior fermentação intestinal e em consequência menor pH. A presença de pH mais baixo sugere a fermentação de microrganismos presentes no sistema digestório com produção de ácidos graxos voláteis (HUANG et al., 2006). De maneira semelhante CLAMBERS et al. (1997) verificaram que amostras com maiores valores, em UFC de *Salmonella*, também foram as que apresentaram pH cecal mais baixo.

CONCLUSÕES

A mistura de ácidos orgânicos (ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metiltiobutanóico), fornecida na concentração de 0,4% na ração, favoreceu o desempenho e a saúde intestinal, frente ao desafio com *Salmonella Typhimurium*, durante o período de um a 28 dias de idade.

REFERÊNCIAS

1. APAAJLAHTI, J. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, p.444-453, 2005.
2. BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Review Science Tecnology**. v. 9, n.2., p. 351-375, 2000.
3. BEAL, R.K.; POWERS, C.; WIGLEY, P.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Avian Pathology**. v. 33, p. 25–33, 2004a.
4. BEAL, R. K. ; WIGLEY, P.; POWERS, C. ; HULME, S. D.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.100, p.151-164, 2004b.
5. BEAUMONT, C.; PROTAIS, J.; PITEL, F.; LEVEQUE, G.; MALO, D.; LANTIER, F. Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier state in fowl. **Poultry Science**. v. 82, p.721–726, 2003.
6. BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. **Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte**. Palestra apresentada na Conferencia AVISUI 2004. Florianópolis SC, 2004.
7. BERTHELOT, F.; BEAUMONT, C.; MOMPART, F.; GIRARD-SANTOSUSSO, O.; PARDON, P.; DUCHET-SUCHAUX, M. Estimated heritability of the resistance to cecal carrier-state of *S. enterica* serovar Enteritidis in chickens. **Poultry Science**. v. 77, p. 797–801, 1998.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União. Brasília, Seção 1, p. 14 em 18/09/2003.
9. BYRD, J. A.; HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J.; BAILEY, R. H.; HERRON, K. L.; MCREYNOLDS, J. L.; BREWER, R. L.; ANDERSON, R. C.; BISCHOFF, K. M.; CALLAWAY, T. R.; KUBENA, L. F. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. **Poultry Science**. v.80, p.278–283, 2001.
10. CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; ZANATTA, G.F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de escherichia coli de origem aviária. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo, v.69, n.2, p.1-5, abr./jun., 2002.

- 11.CHAMBERS, J. R.; SPENCER, J. L.; MODLER, H. W. The influence of complex carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization, pH, and density of broiler ceca. **Poultry Science**. v. 76, p. 445–451, 1997.
- 12.CORNELI, J. Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte. **Dissertação de Mestrado**. Santa Maria, RS – Brasil. 2004, 59 p.
- 13.DASKIRAN, M.; TEETER, R.G.; VANHOOSER, S.L. et al. Effect of dietary acidification on mortality rates, general performance, carcass characteristics, and serum chemistry of broilers exposed to cycling high ambient temperature stress. **Journal Applied Poultry Research**, v.13, p.605-613, 2004.
- 14.DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, **Anais...** Campinas : FACTA. p. 191-203, 2001.
- 15.DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella Enteritidis* phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.99-109.1997.
- 16.DICKEL, E.L. *Salmonella* em produtos avícolas e aspectos da legislação. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Anais...** Santos: FACTA. p. 201-210, 2004.
- 17.DOWLING, R. H. Cellular and molecular basis of intestinal and pancreatic adaptation. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 27, p. 64-67, 1992.
- 18.EIDELSBURGER, U. **Feeding short-chain organic acids to pigs**. Nottingham. Nottingham University Press. p.107-121, 2001.
- 19.FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**. v.24, p.207-216, 2001.
- 20.FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. **5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição**. 04, 05 e 06 de outubro de 2004 – Balneário Camboriú, SC, 2004.
- 21.GARCIA, R. G; ARIKI, J.; MORAES, V. M. B; KRONKA S. N; BORGES, S.A.; MURATA, L.S.; CAMPOS, V.A. Ação isolada ou combinada de ácidos orgânicos e promotor de crescimento em rações de frangos de corte. Campinas, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 2, n. 2, 2000.

- 22.GAUTHIER, R. La Salud Intestinal: Clave de la productividad (El caso de los Ácidos Orgânicos). In: Precongreso Científico Avicola IASA, XXVII Convencion ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México, 2002. **Anais eletrônicos...** [on line] Disponível em: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf>. Acesso em: 16/05/2005.
- 23.GRIEVES, D. B. Inmunologia aviar y aplicacionnes practices. In: XX Congresso Latino Americano de Avicultura. 1991 Quito, Ecuador. **Anais...** p. 1-16,1991.
- 24.HAFEZ, H. M. Perspectiva global de enfermedades emergentes e re-emergentes em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, **Anais...Santos** : FACTA. p. 123-138, 2005.
- 25.HUANG, D. S.; LI, D. F.; XING, J. J.; MA, Y. X.; LI, Z. J.; LV, S. Q. Effects of Feed Particle Size and Feed Form on Survival of *Salmonella typhimurium* in the Alimentary Tract and Cecal *S. typhimurium* Reduction in Growing Broilers. **Poultry Science**. v.8, p.831–836, 2006.
- 26.ITO, N. M. K; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. O. Enfermidades do sistema Nervoso e órgãos do sentido. In BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Editora FACTA: Campinas, SP. Cap. 1, p.51-52. 2000.
- 27.IZAT, A. L.; TIDWELL, N. M.; THOMAS, R. A.; REIBER, M. A.; ADAMS, M. H.; COLBERG, M.; WALDROUP, P. W. Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on the microflora of the intestine and carcass. **Poultry Science**, v. 69, p. 818-826, 1990.
- 28.JUNIOR, A.B.; OLIVEIRA, G.H. Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R. L. Saúde aviária e doenças. Cap.9, p. 96-111. São Paulo: Rocca, 2006.
- 29.KLUGE, H.; BROZ , J., EDER, K. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. **Journal Animal of Physiology Animal**. v. 90, p. 316-324, 2006.
- 30.LAMBERT, R. J.; STRATFORD. M. Weak acid preservatives : modeling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86, p.157-164, 1999.
- 31.LAMONT, S.J.; KAISER, M.G.; LIU, W. Candidate genes for resistance to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.87, p. 423–428, 2002.
- 32.LE NY, P. Use of organic acids in poultry production. Mode of action and applications. In: I Fórum internacional de avicultura. Foz do Iguaçu. **Anais...**, Foz do Iguaçu: Editora Animal World. p.158-165, 2005.

- 33.LEITÃO, M. F. F. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...* Campinas : FACTA. p. 181-190, 2001.
- 34.LI, Z.; YI, G.; YIN, J.; SUN, P.; LI, D.; KNIGHT, C. Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. *Asian-Aust. Journal Animal Science.* v. 21. n. 2, p. 252-261, 2008.
- 35.MACHADO, J. N. Tendências atuais e futuras no uso de colonizadores bacterianos intestinais na avicultura industrial. In: Encontro Internacional de Ciências Aviárias, 4, 2000. Uberlândia. *Anais...* Uberlândia: FAMEV- UFU, 2000, p. 18-27.
- 36.MAIORKA, A. **Efeito da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte.** 2002. 103 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- 37.MAIORKA, A.; SANTIN, A.M.E.; BORGES, S.A.; OPALINSKI, M.; SILVA, A.V.F. Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, lático, cítrico e ascórbico em dietas iniciais de frangos de corte. *Archives of Veterinary Science.* v. 9, n. 1, p. 31-37, 2004.
- 38.PARTANEN, K., MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, v.12, n.1, p.117-145, 1999.
- 39.PENZ, A. M. JR.; SILVA, A. B., RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, 1993. *Anais...* Campinas: FACTA. p.111-119, 1993.
- 40.POPHAL, S.; OETTING, L. **Ácidos orgânicos: Benefícios na Nutrição Animal.** Novus do Brasil, Novus International Inc, s.d.
- 41.RAFACZ-LIVINGSTON, K. A.; PARSONS, C. M.; JUNGKT, R. A. The effects of various organic acids on phytate phosphorus utilization in chicks. *Poultry Science*, v.84, p.1356-1362, 2005a.
- 42.RAFACZ-LIVINGSTON, K.A.; MARTINEZ-AMEZCUA, C.; PARSONS, C. M.; BAKER, D. H.; SNOW, J. Citric acids improves phytate phosphorus utilization in crossbred and commercial broiler chicks. *Poultry Science*, v.84, p.1370-1375, 2005b.
- 43.REZENDE, C. S. M. Ácidos orgânicos em rações experimentalmente contaminadas com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária, Goiânia, Goiás. 94p. 2006.

- 44.RICHARDS J. D.; GONG, J.; LANGE, C. F. M. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 421-435, 2005.
- 45.RODRÍGUEZ, P. Los ácidos orgânicos como agentes antimicrobianos. In: **XVI Curso de Especialización FEDNA**. Madri, 2000.
- 46.ROSTAGNO, H. S **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005.
- 47.RUNHO, R. C.; SAKOMURA, N. K.; KUANA, S.; BANZATTO, D.; JUNQUEIRA, O. M.; STRINGHINI, J. H. Uso de ácido orgânico nas rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 26, n. 6, p. 1183-1191, 1997.
- 48.SADEYEN, J.; TOTEREAU, J.; VELGE, P.; MARLY, J.; BEAUMONT, C.; BARROW, P. A.; BUMSTEAD, N.; LALMANACH, A. C. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. **Microbes and Infection**. v.6, p.1278-1286, 2004.
- 49.SAS ®.2000.**User's Guide: Statistics**, Version 10th. SAS Institute Inc.,Cary, NC.
- 50.SILVA, E. N.; TEIXEIRA, A. S.; FIALHO, E. T.; BERTECHINI, A. G.; SOUZA, P. R. I. Efeitos dos probióticos e antibióticos sobre as vilosidades e ph do trato gastrointestinal de frangos de corte. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.163-173, dez., 2000.
- 51.SKINNER, J. T.; IZAT, A. L.; WALDROUP, P. W. Research note: fumaric acid enhances performance of broiler chickens. **Poultry Science**, v.70, n. 6, p.1444-1447, 1991.
- 52.SNOW, J.L.; BAKER, D.H.; PARSONS, C. Phytase, citric acid, and 1-a-hidroxycolecalciferol improve phytate phosphorus utilization in chicks fed a corn-soybean meal diet. **Poultry Science**, v.83, p.1187-1192, 2004.
- 53.TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, Huntington, v.8, n. 5-6, p.527-533, 1998.
- 54.THOMPSON, J. L.; HINTON, M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonellas in the crop. **British Poultry Science**. v. 3, p. 59-65, 1997.

- 55.VAN IMMERSEEL, F.; FIEVES, V.; BUCK, J; PASMANS, F.; MARTEL, A.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Poultry Science**, v. 83, p.69-74, 2004.
- 56.VIOLA, E. S.; 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.
- 57.VIOLA, E. S; VIEIRA, S. L.; TORRES, C. A.; FREITAS, D. M.; BERRES, J. Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos lático, fórmico, acético e fosfórico no alimento ou na água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.296-302, 2008.
- 58.WALDROUP, P. W.; SKINNER, J. T.; IZAT, A. L. Fumaric acid embrances performance of broiler chickens. **Poultry Science**. v.70, p. 1444-1447, 1991.
- 59.XIE, H.; RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Effects of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide on Broiler Chickens. **Poultry Science**. v. 79, p. 33–40, 2000.

CAPÍTULO 3 – Avaliação da função hepática e bacteriologia de órgãos em frangos de corte inoculados com *Salmonella Typhimurium* e tratados com ácidos orgânicos.

RESUMO: O experimento foi conduzido utilizando-se 630 pintos com um dia de idade com o objetivo de avaliar os efeitos de ácidos orgânicos (ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metiltio-butanóico) frente à inoculação experimental de *Salmonella Typhimurium* sobre parâmetros hepáticos e a bacteriologia dos órgãos. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos e sete repetições de 15 pintos cada. O desafio experimental com *S. Typhimurium* ocorreu por duas vias de administração diferentes: via inglúvio, ao primeiro dia após eclosão, e via ração durante o período de sete a 14 dias de idade. Estes grupos foram tratados ou não com ácidos orgânicos, definindo-se desta forma, um esquema fatorial de 3x2 (ágente versus ácidos). Cada pinto dos tratamentos preconizados para inoculação da bactéria ao primeiro dia de vida receberam via inglúvio a quantidade de $5,0 \times 10^2$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ 0,5mL de *S. Typhimurium*. Os tratamentos preconizados com contaminação via ração, receberam o desafio na dosagem de $5,0 \times 10^2$ UFC de *S. Typhimurium*/ kg de ração. As variáveis estudadas foram: peso relativo do fígado, histopatologia hepática, bioquímica sérica hepática e análises bacteriológicas do ceco, inglúvio, baço e pool de fígado e coração. Sendo utilizado teste de Tukey a 5% para comparação de médias. Aos 21 e 28 dias, foi verificado menor ($p<0,05$) peso de fígado para o grupo inoculado com placebo em detrimento dos grupos inoculados com *S. Typhimurium*. Os grupos tratados com ácidos orgânicos, independente da via de administração de *S. Typhimurium* obtiveram menores freqüências de isolamento em todos os órgãos analisados. Foram observadas alterações ($p<0,05$) para bioquímica sérica hepática e na análise histopatológica do fígado pela atuação da *Salmonella*. Concluiu-se que os ácidos orgânicos foram eficazes no controle na *S. Typhimurium* e não promoveram lesões hepáticas.

Palavras-chave: aves, controle, fígado, função hepática, salmonelose.

Liver function and bacteriology of organs in broiler inoculated with *Salmonella Typhimurium* nalidixic acid resistant and treated with organic acids.

ABSTRACT: It was conducted an experiment with 630 day old experimentally inoculated with *Salmonella Typhimurium* to evaluate the effects of organic acids blend (benzoic acid, fumaric acid, and 2-hydroxi-metiltio-butanoic acid) on the hepatic parameters and the persistence of the bacteria in the organs. The birds were allotted in completely randomized design with six treatments and seven replications with 15 chicks each. The experimental challenge with *Salmonella Typhimurium* nalidixic acid-resistant, occurred in two different routes of administration: in the crop in the first day after hatch, and in the feed offered from seven to 14 days old. These groups were treated with acid in a factorial arrangement 3x2 (agent versus acid). Chicks inoculated with the bacteria in the first day of life received 5.0×10^2 / 0.5 mL of colony forming units (CFU) of *Salmonella Typhimurium* in the crop. The feed contaminated, were challenged in the concentration of 5.0×10^2 CFU of *Salmonella Typhimurium* / kg feed. The variables were: relative weight of the liver, liver histopathology, liver biochemistry serum and bacteriological analyses of the caecum, crop, spleen and pool of livers and hearts. At 21 and 28 days significant less weight of liver to the groups negative control was found. The groups treated with acid, independent of route of administration *Salmonella Typhimurium* had lower rates of isolation in all organs tested. There were changes ($p<0.05$) in serum liver biochemical analysis and liver pathology for *Salmonella* challenged birds. It is possible to conclude that acid was effective to control *Salmonella Typhimurium* and did not promote liver injury.

Keywords: birds, contamination, control, liver, salmonellosis

INTRODUÇÃO

Salmonella enterica é um dos mais importantes patógenos relacionados à saúde pública, podendo ser adquirido pelo consumo de produtos de avícolas (BEAL et al., 2004). As salmonelas paratípicas têm aumentado como uma causa comum toxinfecções alimentares em países industrializados e muito deste incremento se deve a *Salmonella Typhimurium*, sendo um dos principais sorotipos de origem alimentar com distribuição mundial (OLSEN et al. 2001; MUKESH & MUKESH, 2002).

Essa bactéria pode desenvolver uma persistente infecção entérica, geralmente sem apresentar sinais clínicos em aves infectadas após a primeira semana de vida (BEAL et al., 2004), desta forma, é um importante patógeno gastrintestinal, podendo gerar inflamação local, diarréia e progredir para uma infecção sistêmica (BAUCHERON et al., 2005; CARDINALE et al. 2005).

Em estudo investigativo, OLSEN et al. (2003) observaram como sorovar mais freqüente em um abatedouro avícola a *Salmonella Typhimurium*. E na Espanha, a *S. Typhimurium* no ano de 2002, foi um dos principais sorovares envolvidos em surtos, com 22,8% da freqüência de isolamento em surtos determinados por *Salmonela* sp. (ECHEITA et al. 2005).

Durante experimento conduzido por BEAL et al. (2004), houve recuperação desta bactéria no intestino, baço e fígado em aves desafiadas oralmente com uma, três e seis semanas de vida na dose de 10^8 UFC de *Salmonella Typhimurium* ácido nalidíxico resistente.

Um dos principais órgãos atingidos pela *Salmonella* é o fígado. Este órgão é essencial para a manutenção da vida e é um dos mais importantes órgãos de secreção e excreção do corpo. Por estar envolvido com variedades de funções metabólicas, qualquer fator que altere significativamente sua fisiologia normal irá produzir danos hepáticos que terão reflexos no organismo do indivíduo.

Testes bioquímicos podem ser utilizados para detectar várias anormalidades hepáticas, incluindo necrose e lesões nos hepatócitos e alterações nas funções hepáticas. As concentrações das enzimas hepáticas aumentam na circulação à medida que são liberadas pelas células de origem. Dentre as

principais enzimas de função hepática estão a Aspartato Aminotransferase (AST) e a Alanina-Aminotransferase (ALT).

Os achados histopatológicos também podem ser utilizados para detectar anormalidades hepáticas e ainda auxiliar no diagnóstico de doenças. Como descrito por BARCELOS (2005), a infiltração heterófílica no parênquima hepático podem ser vistas em casos agudos por bactérias como *Salmonella*, por exemplo. Por sua vez, DESMIDT et al. (1997) argumentaram que granulomas existentes no fígado durante períodos de estresse ou de infecções intercorrentes pode ocorrer reativação a *Salmonella* e ocasionar infecções em frangos.

Por estes motivos, é essencial que a infecção por *Salmonella* Typhimurium seja controlada, pois além das implicações em saúde pública geradas por esta bactéria, esta pode provocar grandes prejuízos financeiros devido à mortalidade que pode ocorrer durante as primeiras semanas, ao custo com medicação, a baixa qualidade dos pintos e ao custo com medidas de erradicação (HAFEZ, 2005).

Para tanto tem se buscado o uso de produtos alternativos com a finalidade de controlar este patógeno. Dentre os que se encaixam nesta afirmativa estão os ácidos orgânicos. As hipóteses que sustentam o uso dos ácidos orgânicos se relacionam com o efeito inibidor do desenvolvimento de fungos nas matérias-primas e rações e na proliferação de enterobactérias e como potencializador, aumentando a disponibilidade dos nutrientes para as aves (PENZ et al., 1993). De acordo com RICKE (2003), o uso adequado de ácidos orgânicos requer maior entendimento da capacidade e o modo de ação deste produto sobre os diferentes patógenos gastrointestinais.

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos está relacionada à redução do pH e a capacidade de dissociação de suas carboxilas. Na forma não dissociada, esses ácidos podem penetrar passivamente na célula microbiana, produzem íons H⁺ diminuindo o pH intracelular. Esse processo faz com que haja inibição da ação de enzimas ou as células reagem eliminando os prótons com o intuito de manutenção do pH. Esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, resultando em morte do microrganismo (RUSSEL, 1992; BELLAVER & SCHEUERMANN, 2004).

Além disso, os ácidos orgânicos apresentam uma forte ação bacteriostática. São absorvidos pelas bactérias, alterando o DNA presente no núcleo da célula e impedindo a multiplicação celular (LANGHOUT, 2000).

Considerando a preocupação quanto à presença de *Salmonella* na indústria avícola, atribuída à saúde pública e à sanidade animal, o presente trabalho foi proposto e objetivou avaliar a eficácia de ácidos orgânicos em associação ainda não utilizada em aves para o controle de *Salmonella Typhimurium*. Para tanto, avaliou-se a persistência de *Salmonella Typhimurium* nos órgãos e os parâmetros relacionados à função hepática durante o período de um a 28 dias de idade das aves.

MATERIAL E MÉTODOS

Aves e Instalações

O experimento foi realizado durante o período de janeiro a fevereiro de 2008 e desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves da Escola de Veterinária onde se realizou a contaminação experimental das aves, alojamento, avaliação do desempenho e necropsias semanais com coleta de amostras. Os exames histomorfométricos foram realizados no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Goiás. Sendo que as análises microbiológicas de detecção e isolamento da *S. Typhimurium* foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia.

Manejo Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e disposto em esquema fatorial 3x2 avaliando os agentes inoculados (solução salina a 0,85%, *S. Typhimurium* ao primeiro e ao sétimo dia após nascimento) e uso de ácidos orgânicos - 4 kg/Tonelada (com e sem). Ao todo foram seis tratamentos sendo cada um com sete repetições e 15 aves por unidade experimental, totalizando 630 pintos de um dia distribuídos conforme mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Delineamento experimental detalhando os seis tratamentos.

TRATAMENTOS	Desafio <i>S. Typhimurium</i>	Ácidos orgânicos	Nº de aves
T1	Sim (1ºdia de idade) - Via inglúvio	Sim	105
T2	Sim (1ºdia de idade) - Via inglúvio	Não	105
T3	Sim (7º-14º dia de idade) - Ração	Sim	105
T4	Sim (7º-14º dia de idade) - Ração	Não	105
T5	Não - Solução salina a 0,85%	Sim	105
T6	Não - Solução salina a 0,85%	Não	105

O inóculo foi preparado com *Salmonella* Typhimurium isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida por REZENDE (2002). Para obtenção do inóculo a cepa foi repicada em ágar verde brilhante e incubada a 37°C, por 18-20h. Por passagens sucessivas em meios de cultura, a cepa se tornou ácido nalidíxico resistente. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantidas a 4°C e a concentração de $5,0 \times 10^2$ UFC/0,5mL ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001). Sendo então confirmada pelo plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37°C e contagem das UFC de *Salmonella*.

Os pintos dos tratamentos preconizados para inoculação da bactéria ao primeiro dia de vida receberam via inglúvio a dosagem de $5,0 \times 10^2$ unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. Typhimurium*. E os tratamentos controle não receberam a bactéria. Os tratamentos preconizados com contaminação via ração, receberam o desafio durante o período de sete a 14 dias após eclosão via ração com a bactéria na concentração de $5,0 \times 10^2$ UFC de *S. Typhimurium*/ kg de ração de acordo com REZENDE (2002).

Os pintos do tratamento controle foram alojados em ambientes diferentes dos contaminados, com o intuito de evitar contaminação cruzada, porém mantendo similar ambiência e igual manejo.

As aves receberam igual manejo e as mesmas variáveis foram estudadas, diferindo apenas os tratamentos entre si como especificado anteriormente. Cada sala apresentava baterias de cinco andares cada.

Manejo alimentar

As rações fornecidas aos animais, farelada a base de milho moído e farelo de soja, sem antibióticos promotores de crescimento, foram formuladas de acordo com a composição e exigências nutricionais propostas por ROSTAGNO et al. (2005) e todas as aves receberam ração e água “ad libitum”.

O composto de ácidos orgânicos: benzóico (22,44%), fumárico (41,34%) e HMTBa (28,40%) foi fornecido as aves de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante, sendo administrado na ração durante todo o período

experimental na dosagem de 0,4%. Todos os tratamentos durante a mesma faixa etária receberam o mesmo nível de energia e proteína. A ração pré-inicial, inicial e de crescimento forneceram respectivamente, 2.950, 3.000 e 3.100 de energia metabolizável (kcal/kcal de ração) e 22 %, 20,97% e 19,41% de proteína bruta.

Variáveis estudadas

Avaliação de função hepática

Aos 14 e 28 dias de idade, com intuito de avaliação da função hepática das aves, foram coletados de uma ave por parcela, até 5,0 mL de sangue e preparados os soros, sendo estes armazenados a -20°C por até duas semanas para posterior determinação dos valores de ALT e AST. As análises foram realizadas por método cinético com uso de *kit* reagente comercial da marca "Labtest".

Biometria hepática

Nos dias sete, 14, 21 e 28, as aves foram submetidas a jejum alimentar de duas a três horas antes do início da necropsia para eliminação de conteúdo do trato digestório. Uma ave por parcela foi necropsiada, sendo o peso do fígado anotado, realizando-se o cálculo relativo ao peso da ave, de acordo com GRIEVES (1991).

Avaliação histopatológica do fígado

Após pesagem do fígado, aos 14 e 28 dias, um fragmento deste órgão foi coletado de cada parcela visando avaliar os efeitos e prováveis lesões causadas pela *Salmonella* e pelos ácidos orgânicos. Depois de retirar o fragmento, a porção do fígado foi submetida à análise bacteriológica.

Os fragmentos de fígado coletados para avaliação histopatológica foram colocados em frascos previamente identificados contendo formol tamponado a 10% para posterior processamento. Foram processadas 84

amostras de acordo com a metodologia convencional de LUNA (1968). Após 24h da fixação, os fragmentos foram recortados, acondicionados em cassetes e identificados. Em seguida, foram lavados em água de torneira para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratados em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto. Posteriormente, procedeu-se à clarificação com xanol e impregnação em parafina histológica com ponto de fusão a 56° C. Os fragmentos foram incluídos em blocos de parafinas histológicas, seccionados a cinco micrômetros em micrótomo rotativo (American-Optical, modelo Spencer-820), utilizando navalhas descartáveis, laminados, e corados pelo método de Hematoxilina - Eosina (HE).

A avaliação histopatológica foi realizada avaliando-se três parâmetros: irrigação hepática, integridade de hepatócitos e presença de infiltrado linfocitário.

Pesquisa de *S. Typhimurium*

Amostras de conteúdo cecal, suabe de papo, baço e *pool* de fígado e coração de aves controle e infectadas foram coletadas no ato da necropsia com sete, 14, 21 e 28 dias de idade para análise bacteriológica e isolamento da *S. Typhimurium*.

As aves que morreram durante o experimento também foram necropsiadas, realizando-se a coleta do saco da gema, coração, fígado e baço, com a finalidade de detectar a presença da bactéria.

A pesquisa de *S. Typhimurium* foi realizada de acordo com o proposto por GEÓRGIA POULTRY LABORATORY (1997) e BRASIL (2003), com algumas modificações descritas a seguir. Após preparação das amostras de órgãos, estas foram enriquecidas utilizando o caldo Selenito Cistina (CS) em alíquotas de 10 ml e acondicionadas em estufa a 37°C/ 24h.

Após este período, de cada cultura foram feitos repiques nos ágar Verde Brillante, Hektoen e XLT4 e incubadas a 37°C/ 24h. De cada um dos ágares foram selecionadas de três a cinco colônias sugestivas da bactéria e repicadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI), seguindo-se incubação a 37°C/24 h. As amostras bacterianas que apresentaram reações e características compatíveis

as do gênero *Salmonella* foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: produção de indol, produção de H₂S, urease, descarboxilação da lisina, vermelho de metila (VM) e utilização do malonato e motilidade.

Os tubos de análise bioquímica foram incubados a 37ºC por até quatro dias, com leituras diárias, para as provas com resultados negativos nas primeiras 48 horas de incubação e para os testes de descarboxilação ou hidrólise de aminoácidos. As amostras confirmadas bioquimicamente como *Salmonella* foram submetidas aos testes sorológicos com soros polivalentes anti “O”. Aquelas confirmadas na bioquímica e na sorologia foram encaminhadas ao Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) para tipificação sorológica.

Análises Estatísticas

Os resultados de biometria, mortalidade e bioquímica sérica sanguínea foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (2000).

Para os estudos de colonização de *S. Typhimurium* e histopatologia hepática foi utilizado teste descritivo, considerando apenas a freqüência encontrada nas variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o período experimental, as aves foram observadas e os sinais clínicos foram diariamente observados. Verificaram-se discretas excretas fluidas, às vezes com tamponamento de cloaca em poucas aves e em proporção semelhante em todos os tratamentos. Portanto, os aspectos clínicos pela inoculação diretamente no inglúvio e também na ração não foram evidenciados neste estudo, contrariando a afirmação de que algumas disfunções do sistema digestório por alguns sorovares de *Salmonella* paratíficas podem ser notadas e têm sido caracterizadas pelo acúmulo de alimentos e fluidos ao redor da cloaca nas primeiras semanas de vida (BARROW, 2000).

Analizando os resultados da Tabela 1, verifica-se que não houve diferença estatística ($p>0,05$) nas taxas de mortalidade durante o período experimental. Desta forma, a *S. Typhimurium* não foi patogênica e os ácidos orgânicos não apresentaram toxicidade a ponto de levar a mortalidade. Também VIOLA & VIEIRA (2007), utilizando mistura de ácidos orgânicos, não encontraram diferenças nos índices de mortalidade entre os tratamentos.

TABELA 1 – Mortalidade (%) e mortalidade transformada em frangos de corte inoculados com *Salmonella* Typhimurium via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos distribuída durante as semanas experimentais.

	1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	0,32 (0,24)	0,56(0,24)	1,23(0,25)	0,60 (0,24)
Com	0,32 (0,24)	0,31(0,23)	0,00(0,23)	0,95 (0,24)
Agentes inoculados (S)				
Placebo	0,00(0,23)	0,90 (0,24)	0,00 (0,23)	1,37(0,25)
ST- Inglúvio	0,48 (0,24)	0,42 (0,23)	0,42 (0,23)	0,48 (0,23)
ST- Ração	0,48 (0,24)	0,00 (0,23)	1,43 (0,25)	0,48 (0,23)
Fator de Variação (%)				
Ácidos orgânicos	NS	NS	NS	NS
Agentes inoculados	NS	NS	NS	NS
A x S	NS	NS	NS	NS
C.V.	11,28	13,06	16,62	16,69

Letras diferentes na mesma coluna e em mesma faixa etária indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey 5%.

As aves que morreram, no decorrer do experimento, tiveram o saco vitelínico, baço e *pool* de fígado e coração coletados e submetidos a análises

bacteriológicas. Todas as três aves (100%) do controle positivo inoculado com *S. Typhimurium* encontradas mortas apresentaram positividade para a bactéria nos órgãos, submetidos à análise bacteriológica e tipificação sorológica (FIOCRUZ). As cinco aves (100%) dos controles negativos e as duas aves (100%) inoculadas com a bactéria e tratadas com ácidos orgânicos apresentaram ausência do patógeno nas amostras de órgãos analisadas.

Aos sete, 14, 21 e 28 dias sete aves aparentemente normais, de cada tratamento, foram pesadas e sacrificadas. Suabes dos inglúvios, conteúdos dos cecos, baço e *pool* de fígado e coração foram coletados e submetidos à análise bacteriológica (Tabela 2 e Figura 1).

TABELA 2 – Presença (%) de frangos com sete, 14, 21 e 28 dias de idade inoculados experimentalmente via inglúvio e ração com *Salmonella Typhimurium* e tratados com ácidos orgânicos.

Tratamento/ idade	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	Total
INGLÚVIO					
Inglúvio/ sem Ácidos	*4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	1/5 (20,0%)	6/20 (30,0%)
Inglúvio/ com Ácidos	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0,0%)	0/20 (0,0%)
Ração/ sem Ácidos	-	1/5 (20%)	0/5 (0%)	1/5 (20,0%)	2/15 (13,3%)
Ração/ com Ácidos	-	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/15 (0,0%)
CECO					
Inglúvio/ sem Ácidos	5/5(100%)	5/5(100%)	3/4(75%)	2/7(28,5%)	15/21 (71,4%)
Inglúvio/ com Ácidos	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	1/20 (5%)
Ração/ sem Ácidos	-	0/5 (0%)	2/5 (40%)	1/5 (20%)	3/15 (20%)
Ração/ com Ácidos	-	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/15 (0%)
FIGADO E CORAÇÃO					
Inglúvio/ sem Ácidos	4/5 (80%)	4/5 (80%)	2/4 (50%)	3/7 (42,8%)	13/21 (61,9%)
Inglúvio/ com Ácidos	0/5 (0%)	0/5 (0%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	2/20 (10%)
Ração/ sem Ácidos	-	0/5 (0%)	3/5 (60%)	2/5 (40%)	5/15 (33,3%)
Ração/ com Ácidos	-	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/15 (0%)
BAÇO					
Inglúvio/ sem Ácidos	4/5 (80%)	5/5 (100%)	4/4(100%)	2/7(28,5%)	15/21 (71,4%)
Inglúvio/ com Ácidos	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/20 (0%)
Ração/ sem Ácidos	-	0/5 (0%)	1/4 (25%)	2/5 (40%)	3/14 (21,4%)
Ração/ com Ácidos	-	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/15 (0%)

* Número de isolamentos positivos/ número de amostras analisadas.

Também a ração dos grupos contaminados via ração foram analisadas pela bacteriologia convencional e tiveram sua positividade confirmada. Por sua vez, todas as aves necropsiadas dos controles negativos, demonstraram ausência da bactéria. Observa-se que *S. Typhimurium* utilizada experimentalmente na dose de $5,0 \times 10^2$ UFC/ 0,5mL/ ave, como agente desafiante, foi capaz de promover a invasão dos órgãos e colonizar o sistema digestório.

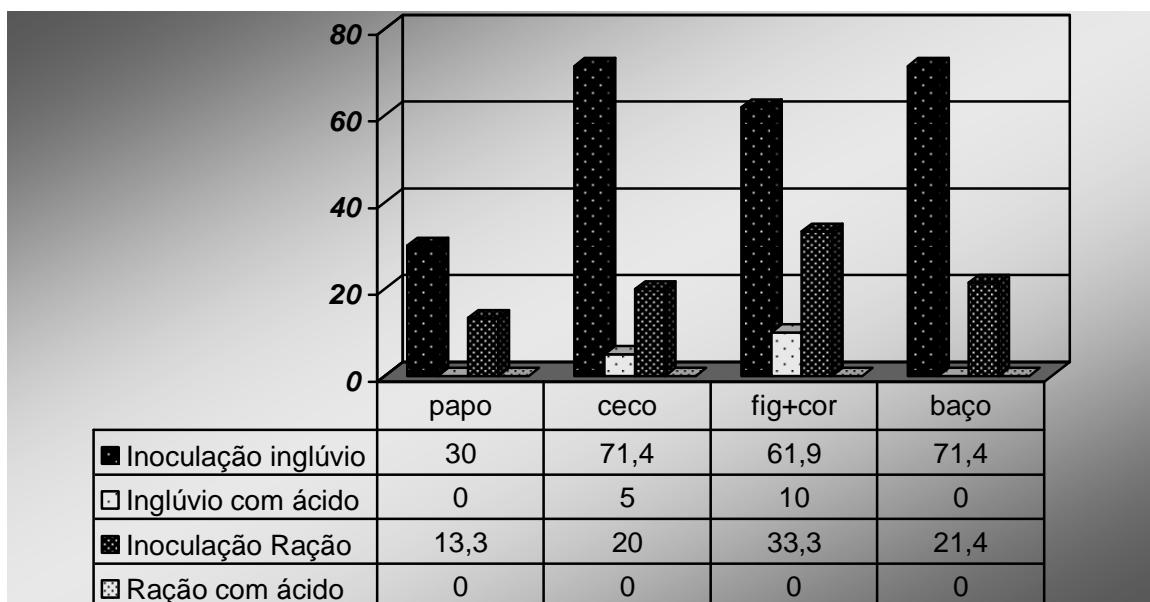


FIGURA 1 - Freqüência total de isolamento nas análises bacteriológicas do inglúvio, ceco, pool de fígado e coração e baço em aves aparentemente saudáveis inoculadas com *Salmonella Typhimurium* viam inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

A elevada detecção nos órgãos é justificada pela afirmativa de que, após ingestão oral, *Salmonella* coloniza o sistema digestório da ave, especialmente os cecos, e posteriormente penetra na mucosa epitelial (DESMIDT et al., 1997). *Salmonella* é capaz de replicar dentro dos fagossomos, sobrevivendo assim dentro dos macrófagos e disseminando-se aos órgãos internos, tais como o fígado, o baço e tecidos reprodutivos estabelecendo um quadro de infecção sistêmica (BOHEZ et al., 2008). Caso o organismo da ave já tenha desenvolvido tecidos linfóides associados ao sistema digestório, pode ocorrer eliminação do patógeno (DESMIDT et al. 1997; HENDERSON et al. 1999).

Apesar da menor freqüência de recuperação do patógeno no inglúvio no presente estudo, deve ser considerada a importância deste órgão na potencial contaminação de carcaça que pode ocorrer durante o abate. O papo das aves, por constituir-se de um meio ácido, ajuda na proteção do sistema digestório contra patógenos, fornecendo uma barreira natural de proteção. No entanto, o período de jejum que precede o abate ocasiona redução no número de bactérias láticas, resultando em aumento no pH do inglúvio, e consequentemente, aumento da população de microrganismos patogênicos, como *S. Typhimurium* no inglúvio (HINTON et al., 2000; BYRD et al., 2001).

Assim como neste experimento, também BRITO et al. (1995), inoculando pintos de um dia de vida com *S. Typhimurium*, via ração e inglúvio verificaram que a colonização do sistema digestório e de órgãos viscerais ocorreu de forma mais rápida e intensa em aves inoculadas via inglúvio.

Observa-se também na Figura 1 e Tabela 2, que os grupos tratados com ácidos orgânicos, independente da via de administração de *S. Typhimurium* obtiveram menores freqüências de isolamento em todos os órgãos analisados que seus grupos que receberam a ração com os ácidos.

Esse resultado é justificado pela afirmativa de que os ácidos orgânicos apresentam benefícios como: redução de bactérias ácido-intolerantes como *Salmonella* sp., promovendo melhoria da digestibilidade da energia e da proteína, provavelmente, devido à redução da carga microbiana. A redução microbiana no intestino diminui a produção de amônia e outros metabólitos e reduziu o estímulo imune local, resultando na melhoria da saúde intestinal (POPHAL & OETTING, s.d.).

Também aos sete, 14, 21 e 28 dias, o fígado de uma ave por parcela foi pesado e realizado o cálculo para peso relativo do órgão. Observa-se na Tabela 3 que houve interação ($p<0,05$) nesta variável aos sete, 21 e 28 dias e os desdobramentos estão apresentados na Tabela 4. Nota-se que aos sete dias (Tabela 4) o grupo inoculado com placebo e tratado com ácidos orgânicos apresentaram menor peso de fígado ($p<0,05$) que seu respectivo grupo sem ácido.

TABELA 3 – Peso relativo do fígado (g) aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade em frangos de corte inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	3,98	2,97	3,09	2,98
Com	4,27	2,88	2,64	2,82
Agentes inoculados (S)				
Placebo	3,72	2,84	2,25	1,95
ST- Inglúvio	4,53	2,97	3,13	3,18
ST- Ração	-	2,97	3,22	3,55
Fator de Variação (%)				
Ácidos orgânicos	NS	NS	<0,01	NS
Agentes inoculados	<0,01	NS	<0,01	<0,01
A x S	<0,01	NS	<0,01	0,01
C.V.	13,46	8,91	15,81	11,67

Letras diferentes na mesma coluna e em mesma faixa etária indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

O mesmo efeito foi observado aos 21 dias no grupo inoculado via inglúvio e tratado com ácidos orgânicos. Por sua vez, LI et al. (2008), abordando os índices de biometria do fígado, mostraram uma tendência a decréscimo no peso deste órgão, com a utilização de associação com ácido fumárico, benzóico e HTMBa a 0,5% e 1% quando comparada com grupo controle.

TABELA 4 – Desdobramento das interações entre agentes inoculados e de ácidos orgânicos para peso de fígado (g) em frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* e tratados com ácidos orgânicos.

Peso fígado sete dias		
Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio
Ácidos orgânicos		
Sem	3,28Bb	4,68Aa
Com	4,16Aa	4,37Aa
Peso fígado 21 dias		
Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio
Ácidos orgânicos		
Sem	2,22Ab	3,67Aa
Com	2,27Ab	2,58Bab
Peso fígado 28 dias		
Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio
Ácidos orgânicos		
Sem	2,00Ac	3,08Ab
Com	1,90Ab	3,29Aa

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente utilizando teste de Tukey a 5%.

Observa-se também (Tabela 4) que o grupo inoculado com placebo obteve menores valores que os inoculados aos sete, 21 e 28 dias. O aumento do peso de fígado, relacionado aos grupos inoculados, provavelmente é resultante de um processo infeccioso, pela disseminação da *Salmonella* nos órgãos sistêmicos. Esta observação encontra respaldo no estudo realizado por BARROW (1999) quando afirmou que a *Salmonella* é capaz de disseminar aos órgãos internos, tais como o fígado, estabelecendo um quadro de uma infecção sistêmica. Também XIE et al. (2000) verificaram aumento ($p<0,05$) do peso relativo do fígado de todos os frangos de corte quando inocularam LPS de *S. Typhimurium*. Da mesma forma, VAN HEMERT et al. (2006) verificaram um aumento no número de UFC nas amostras de fígado analisadas, até o sétimo dia após inoculação da bactéria.

Aos 14 e 28 dias, de uma ave por parcela foi coletado sangue e o soro foi submetido à análise com *kits* comerciais para determinação dos níveis de enzimas hepáticas AST e ALT. Essas variáveis bioquímicas têm sido usadas como auxiliares do diagnóstico de enfermidades nos animais domésticos, contudo existem poucos trabalhos sobre os níveis de referência dessas variáveis em aves, sendo talvez a causa da pouca utilização de exames de laboratório na área de patologia aviária.

Observa-se (Tabela 5) que a inoculação de *S. Typhimurium* influenciou ($p<0,05$) os valores de ALT aos 28 dias. Sendo que aves inoculadas via inglúvio apresentaram maiores valores que o grupo inoculado via ração. Também houve diferenças (Tabela 5), quando da adição de ácidos orgânicos, sendo observado maior valor para ALT. A elevação dos níveis sérico-enzimáticos atribuída à disfunção hepática pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de necrose, ou das alterações na permeabilidade da membrana celular (ALT, AST) (BORSA et al., 2006).

TABELA 5 – Resultado de bioquímica sérica hepática para valores das enzimas: AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase) aos 14 e 28 dias de idade em frangos de corte inoculados com *Salmonella* Typhimurium via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	14 dias		28 dias	
	AST	ALT	AST	ALT
Ácidos orgânicos (A)				
Sem	291,86	16,95	322,42	7,76 B
Com	278,09	13,76	322,33	10,47A
Agentes inoculados (S)				
Placebo	292,43	19,86	293,92	8,57 AB
ST- Inglúvio	284,28	13,36	375,28	11,43 A
ST- Ração	278,21	12,86	297,93	7,36 B
Fator de Variação (%)				
Ácidos orgânicos	NS	NS	NS	0,04
Agentes inoculados	NS	NS	NS	0,04
A x S	<0,01	NS	NS	NS
C.V. (%)	20,46	61,27	30,04	46,85

Letras diferentes na mesma coluna e em mesma faixa etária indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Na Tabela 6, nota-se que somente o grupo inoculado via inglúvio, que receberam os ácidos orgânicos demonstraram diferenças ($p<0,05$) com menores valores de enzima AST que seu respectivo grupo sem ácidos. Esse dado, levando em consideração a citação anterior de BORSA et al. (2006), é positivo, pois com a adição do produto provavelmente, houve impedimento de injúrias teciduais que seriam provocadas por *Salmonella* e sugere-se também que os ácidos orgânicos não foram hepatotóxicos.

TABELA 6 - Desdobramento das interações significativas entre agentes inoculados e utilização de ácidos orgânicos para valores de AST aos 14 dias de idade em frangos de corte inoculados com *Salmonella* Typhimurium via inglúvio e ração e tratados com ácidos orgânicos.

	Agentes inoculados		
	Placebo	ST- Inglúvio	ST- Ração
Ácidos orgânicos			
Sem	272,71Aa	346,71Aa	256,14Aa
Com	312,14Aa	221,86Ba	300,29Aa

Letras maiúsculas (minúscula) diferentes na mesma coluna (linha) indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

Por isso, as alterações observadas neste experimento, são justificadas pela afirmativa que a Aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial presente em vários tecidos como fígado, músculo esquelético e cardíaco, de todas as espécies domésticas com alta atividade no fígado, portanto, na injúria hepática aguda ou crônica, a atividade sérica de AST está elevada (FRANCISCATO, 2006).

O aumento de AST pode ser atribuído às alterações da permeabilidade de células hepáticas e/ou de sua morte, já que certas enzimas podem ser detectadas no soro sanguíneo, portanto a elevação da atividade enzimática está relacionada com o grau de lesão nos hepatócitos (BUTKERAITIS, 2003).

Assim como a bioquímica sérica, os achados histopatológicos também podem ser utilizados para detectar várias anormalidades hepáticas e ajudar no diagnóstico de doenças em aves. Aos 14 e 28 dias de idade, com o intuito de averiguar lesões histopatológicas, foi coletado fragmento de fígado de uma ave por parcela e foram confeccionadas lâminas (Tabela 7).

TABELA 7 – Alterações histopatológicas reveladas em 84 análises de fígado aos 14 e 28 dias de frangos inoculados com *Salmonella Typhimurium* via inglúvio e ração e tratadas com ácidos orgânicos.

Tratamentos	14 dias		28 dias	
	Necrose	Infiltrado linfocitário	Necrose	Infiltrado linfocitário
Controle negativo	0%	0%	0%	0%
Controle negativo dos ácidos	0%	0%	0%	0%
Inoculação no inglúvio	14,3%	14,3%	71,4%	28,6%
<i>Salmonella</i> inglúvio e ácidos	14,3%	0%	66,6%	14,3%
Inoculação na ração	14,3%	0%	100%	14,3%
<i>Salmonella</i> ração e ácidos	14,3%	0%	50%	14,3%

Aos 14 dias e 28 dias, o grupo controle negativo assim como o controle negativo dos ácidos orgânicos na análise histopatológica do fígado, não demonstrou nenhuma lesão digna de ser relatada. Esse dado indica que os ácidos não produziram efeito tóxico sobre o organismo das aves.

Já os grupos inoculados com *S. Typhimurium* não apresentaram diferenças relevantes entre si aos 14 dias, porém diferiram dos grupos controles por apresentarem focos de necrose dos hepatócitos. O grupo inoculado com o

patógeno via inglúvio apresentou alterações mais severas predominando um quadro de necrose difusa (1/7) e (1/7) com infiltrado peri-portal.

Aos 28 dias, os grupos inoculados com *S. Typhimurium* e tratados com ácidos orgânicos mostraram melhores resultados (66,6% e 50%), com menor grau de lesão nos hepatócitos que seus respectivos grupos sem ácidos (71,4% e 100%), porém com pior resultado que os grupos controle negativo. Esse último fato pode ter relação com níveis mais elevados de ALT observado, durante o mesmo período, para o grupo com ácidos orgânicos em detrimento do grupo controle sem ácidos.

Também aos 28 dias, os grupos inoculados sem tratamento com ácidos orgânicos, diferiram do controle negativo por grau de alterações hepáticas, já que apresentaram necrose massiva nas lâminas observadas. Sendo que assim como aos 14 dias, o grupo inoculado via inglúvio também apresentou maiores alterações que todos os seis grupos, onde uma parcela (1/7) apresentou múltiplos focos de infiltrado linfocitário (granuloma) e uma parcela (1/7) com infiltrado peri-portal.

Embora as lesões sejam bastante diversas, achados microscópicos de necrose multifocal dos hepatócitos com infiltração linfocitária no parênquima hepático podem ser vistas em casos agudos por bactérias (BARCELOS, 2005). Em experimento conduzido por BRITO et al. (1995) pintos de um dia de vida foram inoculados com *S. Typhimurium* via ração e inglúvio. Ao exame histopatológico os fígados apresentaram várias áreas de necrose nos hepatócitos, heterófilos e infiltração de células mononucleares. DESMIDT et al. (1997), argumentaram que aves infectadas por *Salmonella* podem apresentar granulomas que uma vez reativados ocasionam infecções em frangos.

CONCLUSÕES

Os ácidos orgânicos (ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metiltiobutanóico) foram eficazes no controle na *Salmonella Typhimurium* na dosagem de 0,4% na ração, conferindo menores freqüências de isolamento dos órgãos e não promovendo lesões nas células hepáticas.

REFERÊNCIAS

1. ASSIS, A. C. B.; SANTOS, B. M. Patogenicidade *In Vivo* e *In Vitro* de amostras de *Escherichia Coli* de Origem Avária. **Revista Brasileira de Ciência Avícola.** v. 3, n.2, Campinas, 2001.
- 2.BARCELOS, A. S. Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária. **Dissertação de Mestrado.** Santa Maria, RS, 2005, 83 p.
- 3.BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis* **Avian Pathology**, v.20, p 145-153, 1999.
- 4.BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Review Science Technology.** v. 19, n.2, p. 351-375, 2000.
- 5.BAUCHERON, S.; MOULINE, C.; PRAUD, K.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 55, p. 707–712, 2005.
- 6.BEAL, R. K. ; WIGLEY, P.; POWERS, C. ; HULME, S. D.; BARROW, P. A.; SMITH,. A. L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v.100, p.151-164, 2004.
- 7.BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. **Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte.** Palestra apresentada na Conferência AVISUI 2004. Florianópolis, SC, 2004.
- 8.BOHEZ, L.; GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; DEWULF, J.; HAESBROUCK, F.; IMMERSEEL, F. V. The *Salmonella* Pathogenicity Island 2 regulator *ssrA* promotes reproductive tract but not intestinal colonization in chickens. **Veterinary Microbiology.** v. 126, p. 216-224, 2008.
- 9.BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L. P.; SAITO, M. E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 58, n. 4, p.675-677, 2006.
- 10.BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Diário Oficial da União. Brasília, Seção 1, p.14 em 18/09/2003.

- 11.BRITO,J. R. F. ; XU, Y.; HINTON, M.; PEARSON, G. R. Pathological findings in the intestinal tract and liver of chicks after exposure to *Salmonella* serotypes Typhimurium or Kedougou. **British Veterinary Journal.** v. 151,p. 311- 323, 1995.
- 12.BUTKERAITIS, P. Efeitos da fumonisina B1 em codornas poedeiras (*Coturnix coturnix japonica*). **Dissertação de Mestrado.** Universidade de São Paulo. Pirassununga, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003. 109p.
- 13.BYRD, J. A.; HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J.; BAILEY, R. H.; HERRON, K. L.; MCREYNOLDS, J. L.; BREWER, R. L.; ANDERSON, R. C.; BISCHOFF, K. M.; CALLAWAY, T. R.; KUBENA, L. F. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. **Poultry Science.** v.80, p.278–283, 2001.
- 14.CARDINALE, E., GROS-CLAUDE, J.D.P., RIVOAL, K., ROSE, V., TALL, F., MEAD, G.C. AND SALVAT, G. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* spp. enterica serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. **Journal Applied of Microbiology.** v. 99, p. 968–977, 2005.
- 15.DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.99-109, 1997.
- 16.DHILLON, A. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; ALISANTOSA,B. N; JACK, O.; SCHABERG, D.;BANDLI,D.; JOHSNSON, S. Pathogenicity of environmental origin *Salmonellas* in specific pathogen-free chicks. **Poultry Science**, v. 80, n.9, p. 1323-1328, 2001.
- 17.ECHEITA, A.; ALADUENA, A.; GONZALEZ-SANZ, R.; DIEZ, R.; DE LA FUENTE, M.; CERDAN, F.; ARROLLO, M. ; GUTIERREZ, R. Analisis de las cepas de *Salmonella* spp. isoladas de muestras clínicas de origen humano en Espana anos 2002 y 2003 (I). **Boletin Epidemiologico Semanal.** v.13, p. 73–76, 2005.
- 18.FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.;CALVO, S.;MARCA,M.C. Control of of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease.** v.24, p.207-216, 2001.
- 19.FRANCISCATO, C. Avaliação dos minerais séricos e da função hepática de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina e submetidos a diferentes concentrações de montmorilonita sódica na dieta **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, 2006. 38p.

- 20.GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments.** Oakwood: Georgia Poultry Laboratory [Workshop]. 1997.293p.
- 21.GRIEVES, D. B. Inmunologia aviar y aplicacionnes practices. In: XX Congresso Latino Americano de Avicultura. 1991, Quito, Ecuador. **Anais...** Quito: ACA, p. 1-16. 1991.
- 22.HAFEZ, H.M. Perspectiva global de enfermedades emergentes e re-emergentes em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, **Anais...** Santos : Facta, p. 123-138. , 2005.
- 23.HENDERSON, S.C., BOUNOUS, D.I., LEE, M.D. Early events in the pathogeneses of avian salmonellosis. **Infectotion and Immunity**, v.67, n.7 p.3580-3586,1999.
- 24.HINTON, A. Jr.; BUHR, R. J.; 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.
- 25.LAMARCHE, M. G.; DOZOIS, C. M.; DAIGLE , F. C.; AZA, M.; CURTIS, R.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Inactivation of the Pstsystem reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infection and Immunity**, v.73, n.7, p.4138-4145, 2005.
- 26.LANGHOUT, P. **Feed Mix – Special: Alternatives to antibiotics**, 2000.
- 27.LI, Z.; YI, G.; YIN, J.; SUN, P.; LI, D.; KNIGHT, C. Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. **Asian-Australasian Journal Animal Science**. v. 21. n. 2, p. 252-261, 2008.
- 28.LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
- 29.MUKESH, D. S.; MUKESH, G. S. Serotypic and antibiotic susceptibility pattern of *Salmonella* species isolated from cases os gastroenteritis at Infectious Disease Hospital (IDH), Delhi from 1997-2000. **Journal of Communicable Diseases**, v. 34, n. 4, p. 237-244, 2002.
- 30.OLSEN, S. J.; BISHOP, R.; BRENNER, F. W.; ROELS, T. H.; BEAN, N.; TAUXE, R. V.; SLUTSKER, L. The Changing Epidemiology of *Salmonella*: Trends in Serotypes Isolates from Human in the States, 1987-1997. **Journal of the Infectious Diseases**. v. 183, p.753-761, 2001.
- 31.OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markets. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p.826-835, 2003.

- 32.PENZ, A. M. JR; SILVA, A. B., RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, 1993. **Anais...** Campinas: FACTA, p.111-119, 1993.
- 33.POPHAL, S.; OETTING, L. **ÁCIDOS ORGÂNICOS: Benefícios na Nutrição Animal.** Novus do Brasil, Novus International Inc, s.d.
- 34.REZENDE, C. S. M. Ácidos orgânicos em rações experimentalmente contaminadas com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária, Goiânia, Goiás. 94p. 2006.
- 35.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.
- 36.ROSTAGNO, H. S **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais.** Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005.
- 37.RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.363-370, 1992.
- 38.SAS ®.2000.**User's Guide: Statistics**, Version 10th. SAS Institute Inc.,Cary, NC.
- 39.VAN HEMERT, S.; HOEKMAN A.. J. W.; SMITS, M. A.; REBEL, J. M. J. Gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine differ between lines **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.114, 247–258, 2006.
- 40.VIOLA, E. S.; 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.
- 41.XIE, H.; RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Effects of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide on Broiler Chickens. **Poultry Science**. v. 79, p. 33–40, 2000.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma necessidade de mercado tem sido a crescente preocupação da população com o consumo de carne de frango de qualidade, isso só é possível através da adoção de procedimentos que visam controlar *Salmonella* sp.

Para este controle, o uso de antibióticos promotores de crescimento tem demonstrado utilidade em estabilizar a microbiota intestinal e melhorar o desempenho de aves, além de prevenir processos patológicos intestinais específicos. Estudos realizados indicam que a simples retirada dos antibióticos promotores de crescimento da dieta de frangos de corte gera um impacto negativo sobre a saúde animal e aumento da mortalidade. No entanto, há um questionamento crescente em relação a essa prática.

Desse modo, surge a necessidade de se introduzir estratégias novas a fim de contornar tais efeitos. Uma abordagem nutricional amplamente utilizada é o uso de novos aditivos alimentares como os ácidos orgânicos que são eficazes na melhoria do desempenho das aves, hipoteticamente através de uma modulação da microbiota no trato intestinal.

Estas considerações argumentam o presente estudo e a partir da análise do conjunto de todas as variáveis, foi possível verificar que os ácidos orgânicos melhoraram os parâmetros de desempenho e a saúde intestinal na dosagem de 0,4% na ração, conferindo melhores resultados quando da utilização do produto nas condições deste experimento.

O composto com ácidos orgânicos na dosagem utilizada também demonstrou eficácia na eliminação da *Salmonella Typhimurium* conferindo menores freqüências de isolamento dos órgãos e com melhores resultados nos parâmetros hepáticos.

Como a concentração foi eficaz para o objetivo proposto, estudos posteriores com menores concentrações são úteis, já que poderão gerar menor custo para os produtores na utilização do composto de ácidos orgânicos do presente estudo. Da mesma forma, pesquisas que comprovem a eficácia do produto no controle de outros sorovares de *Salmonella* e patógenos relacionados à saúde pública serão importantes. Além disso, a administração em outra via

diferente da utilizada, como na água de bebida, por exemplo, poderia ser utilizada na fase de jejum que antecede o abate das aves.

Porém apesar do composto ter gerado bons resultados no controle de *Salmonella Typhimurium*, medidas de biossegurança e manejo devem ser adotadas para eliminação ou controle deste patógeno na indústria avícola visando o fornecimento de alimentos seguros ao homem.