

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

**ÁCIDO ACÉTICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE  
EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS COM *Salmonella* Enteritidis E  
*Salmonella* Typhimurium**

Nome: Cintia Silva Minafra e Rezende  
Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

Goiânia  
2006

CINTIA SILVA MINAFRA E REZENDE

**ÁCIDO ACÉTICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE  
EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS COM *Salmonella* Enteritidis E  
*Salmonella* Typhimurium**

Tese apresentada para obtenção do  
grau de Doutor em Ciência Animal  
junto à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**  
Sanidade Animal

**Orientadora:**

Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. José Henrique Stringhini

Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes

Goiânia  
2006

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

**Rezende, Cíntia Silva Minafra e.**  
**R467a**    **Ácidos orgânicos em rações experimentalmente contamina-**  
**das com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium / Cíntia Silva Minafra e Rezende. – Goiânia, 2006.**  
**ix, 94f. : il., color., figs., tabs.**

**Orientador: Albenones José de Mesquita.**

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2006.**

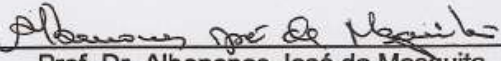
**Bibliografia.**

**1. Frango – Contaminação bacteriana 2. Frango – Desempenho - Ração 3. Ração - Contaminação 4. Ácido orgânico – Tratamento - Ração I. Mesquita, Albenones José de II. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária III. Título.**

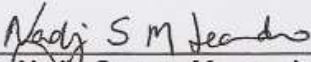
**CDU: 636.52/.58:616-022.1**

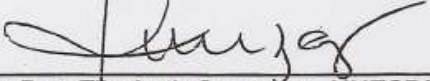
**CÍNTIA SILVA MINAFRA E REZENDE**

Tese defendida e aprovada em 28/11/2006 pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

  
Prof. Dr. Albenones José de Mesquita  
(ORIENTADOR (A))

  
Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade - Memória

  
Profa. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro

  
Profa. Dra. Elisabeth Gonzales - UNESP/Botucatu

  
Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior - UNESP/Jabotical

## RESUMO:

Foram conduzidos três experimentos, separadamente, utilizando-se pintos com um dia de idade, linhagem Cobb. Em cada fase experimental, duzentos pintos foram distribuídos em cinco tratamentos e quatro repetições de dez aves cada. A ração foi formulada a base de milho e soja, conforme as exigências nutricionais, e não utilizou-se produtos de origem animal ou conservantes. Esta ração foi contaminada experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium e tratada com ácidos orgânicos isoladamente - acético, fórmico e propiônico - em cinco diferentes concentrações (0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%), no período de sete a vinte e um dias de idade. Simultaneamente foram analisados o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, assim como a eficiência do ácido em reduzir ou eliminar o patógeno das rações tratadas, nos diferentes níveis. Avaliou-se ainda a presença do agente nas excretas, *swabs* cloacais e *pool* de fígado, coração e vesícula biliar de uma ave de cada parcela experimental para cada ácido orgânico. Para o ensaio com ácido acético, verificou-se que os níveis de 0,5, 1,0 e 2,0% não alteraram o desempenho das aves. No entanto, a concentração de 1,5% determinou redução de ganho de peso no período inicial de vida dos pintos. Quanto à recuperação de *Salmonella* spp. de rações tratadas, observou-se que a concentração de 1,5% de ácido acético apresentou maior redução da contaminação. Não foi registrada a ocorrência da bactéria em *pool* de órgãos. Constatou-se que excretas e *swabs* cloacais apresentaram freqüência de isolamento de 60% e 2%, respectivamente, para *Salmonella* Typhimurium. O ácido acético na concentração de 1,5% foi efetivo na redução de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium na ração, mas o desempenho foi piorado. Quanto ao ácido fórmico, verificou-se que os níveis de ácido pesquisados não alteraram o desempenho das aves. Quanto à recuperação de *Salmonella* spp. das rações tratadas, observou-se que os níveis de 1,5% e 2,0% de ácido fórmico apresentaram redução da contaminação por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Não observou-se isolamento da bactéria em *pool* de órgãos. No entanto, constatou-se que excretas e *swabs* cloacais apresentaram freqüência de isolamento de 55% e 50%, respectivamente, para *Salmonella* Typhimurium. Ácido fórmico adicionado à ração nas concentrações de 1,5 e 2,0% reduz a contaminação por *Salmonella* spp. sem afetar o desempenho. Os resultados referentes ao ácido propiônico revelaram que os níveis de ácido avaliados não alteraram o desempenho das aves. No entanto, tendo em vista a recuperação de *Salmonella* spp. das rações tratadas, observou-se que o nível de 0,5% do ácido reduziu a contaminação e os níveis de 1,0%, 1,5% e 2,0% de ácido propiônico foram eficientes quanto à eliminação do patógeno. Observou-se freqüência relativa de isolamento em *pool* de órgãos, excretas e *swabs* cloacais de 10%, 80% e 100%, respectivamente, para *Salmonella* spp.. Ácido propiônico foi efetivo em reduzir e eliminar *Salmonella* spp. de rações.

**Palavras-chave:** Ácido acético, ácido fórmico, ácido propiônico, contaminação bacteriana, desempenho, frango de corte, ração.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A qualidade da carne de frango é fator relevante quando se analisa a segurança alimentar da população mundial. A veiculação de doenças entre animais e o homem constitui tema de preocupação global do ponto de vista técnico-científico e comercial. Enquadra-se, neste contexto, o complexo agroindustrial de comércio internacional de carnes avícola, suína ou bovina.

SILVA (2006) relatou que, nos últimos cinco anos, o Brasil tem se destacado no comércio internacional de carnes, com índices de desempenho expressivos nas exportações. A segurança e o controle de qualidade dos alimentos estão alicerçados nas exigências do mercado internacional e os sistemas de gestão da qualidade da cadeia avícola apontam para cuidados com matérias-primas, produtos e subprodutos.

Do ponto de vista sanitário, as aves são suscetíveis à infecção por diversos agentes patogênicos, capazes de causar dano à saúde pública. Entre esses agentes, destacam-se as bactérias do gênero *Salmonella* que podem estar presentes no ambiente avícola de modo generalizado. *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium estão incluídas entre os sorovares potencialmente agressivos às aves e aos humanos, sendo apontadas como microrganismos patogênicos isolados de matérias-primas, rações, ovos, carne de aves e incriminados em surtos de toxinfecções alimentares.

Segundo o relatório da Rede Européia de Vigilância de *Salmonella*, comentado por SALM-NET (1997), BARROW (1999) e NASCIMENTO et al. (2000), a presença de *Salmonella* spp. no ambiente avícola, rações e nas próprias aves tem implicação direta no controle do patógeno em carcaças processadas e produtos industrializados.

KLEIN (1999), citando as informações da Comissão do *Codex Alimentarius* da Organização para Agricultura e Alimentação (FAO), destacou como componente fundamental ao estudo da segurança alimentar, a análise e avaliação de perigos, riscos e pontos críticos de controle em todas as etapas do ciclo de produção das aves, dando ênfase ao gênero *Salmonella*.

Segundo HENZLER & OPITZ (1999), o monitoramento dos ingredientes que permitem sobrevivência do agente é imprescindível, não somente os de

origem animal, mas os de origem vegetal, além da adoção de boas práticas de higienização do ambiente das fábricas, equipamentos e silos; o controle de umidade, pó ou resíduos; o controle de pragas como pássaros, roedores e insetos. Conforme KLEIN (1999), o programa de análise de perigos e pontos críticos de controle é imprescindível.

OLIVEIRA (1996), analisando vísceras destinadas à fabricação de farinhas, verificou que este subproduto submetido ao tratamento térmico mostrou-se livre de *Salmonella* spp., quando do seu beneficiamento industrial, no entanto, o produto final apresentou-se contaminado pelo agente, revelando ter ocorrido contaminação durante as fases de resfriamento e armazenamento.

ROCHA (2001) avaliou 18 lotes de frangos de corte no Estado de Goiás e comprovou a existência de positividade para *Salmonella* spp. em 77,78% deles. Das 1206 amostras analisadas e estratificadas em pintos de um dia, forros de caixas de transporte de pintos, frangos, swabs de arrasto da cama de aviários e rações finais, observou uma frequência de positividade em 3,03%, 11,11%, 0,69%, 4,17% e 8,89%, respectivamente. Encontrou uma frequência de *Salmonella* spp. de 4,48% do total de amostras.

REZENDE (2002), avaliando doze lotes de frangos em três abatedouros no Estado de Goiás, identificou que 75% desses foram positivos para *Salmonella* sp.. Do total de amostras analisadas (excretas, vísceras destinadas à fabricação de farinhas, carcaças, vísceras comestíveis e água de tanque de pré-resfriamento), 9,39% demonstraram o isolamento do agente, sendo identificados seis sorovares. Ressalta-se que *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium foram os de maior frequência com 67,66% e 11,76% de isolamento, respectivamente.

Entre os tratamentos de rações e seus ingredientes, para eliminação de *Salmonella* sp., os mais conhecidos são o tratamento térmico conferido pela peletização e o tratamento químico pela adição de ácidos orgânicos. BERCHIERI JÚNIOR (2000) ponderou que a peletização é eficiente para controle/eliminação do patógeno, dependendo do tempo de exposição ao calor, temperatura e teor de umidade da ração, sendo normalmente comprometido pela possibilidade de recontaminação.

Ácidos orgânicos são classificados na categoria de aditivos químicos (GONZALES, 2002) e alguns empregados na alimentação animal. Contêm uma

ou mais carboxilas (R-COOH) e são ácidos fracos de cadeia curta, possuindo entre 1 e 7 carbonos. Por estas características, são apontados como agentes de atividade antimicrobiana, em que o pH do meio desempenha papel relevante na preservação de rações (DIBNER & BUTTIN, 2002).

A ação antimicrobiana desses aditivos de rações animais, ainda gera muita discussão (BLACK et al., 2006). Possuem poder bacteriostático e bactericida desde que haja moléculas dissociadas em quantidade suficiente e tempo de contato adequado com o alvo. PENZ JÚNIOR et al. (1993) informaram que os ácidos orgânicos estão relacionados ao efeito inibidor de desenvolvimento de fungos nas matérias-primas e rações, proliferação de enterobactérias e potencializador da disponibilidade de nutrientes para aves.

Segundo LE NY (2005), os ácidos têm primordialmente dois modos de ação, diminuição de pH intracelular, desfavorecendo a permanência dos patógenos e interferência na síntese de DNA pela interrupção da síntese protéica.

De acordo com DIBNER & BUTTIN (2002), a maioria dos ácidos orgânicos com atividade antimicrobiana tem pKa entre 3,0 e 5,0, ou seja, pH em que 50% de sua dissociação ocorre.

PALENZUELA (s.d) relatou que a maioria das bactérias crescem mal em pH inferior a 5,0, porém essa condição não garante a esterilidade microbiológica, pois muitos gêneros podem sobreviver nestas condições durante longos períodos de tempo. Segundo o autor, pH extracelular distante de 7,0 perturba o gradiente de prótons, que é o principal componente da força próton-motriz, necessária aos processos de transporte através da membrana, motilidade e síntese de ATP acoplada ao processo respiratório. Além disso, o metabolismo anaeróbico de bactérias é regulado pelo pH do meio.

RYCHLIK & BARROW (2005) explicaram a interiorização dos ácidos orgânicos, na sua forma não-dissociada, em células bacterianas devido à sua lipossolubilidade. Uma vez dentro da célula, ocorre dissociação, com liberação de H<sup>+</sup>, acidificando o meio intracelular. CHOCT (2004) ponderou que a presença da carboxila no meio intracelular é suficiente para que não ocorra replicação protéica. Com aumento da quantidade de H<sup>+</sup>, há necessidade de eliminação desses prótons na tentativa de elevação do pH interno. Isto promove intenso gasto energético dificultando o desenvolvimento bacteriano (RICKE, 2003).



Reforçando a teoria da atividade bactericida, DIBNER & BUTTIN (2002) verificaram que em pH baixo o ácido orgânico está na forma não-dissociada, mas o pH elevado do ambiente citoplasmático bacteriano promove dissociação do ácido em ânions e cátions. Como resultado, ocorre diminuição do pH intracelular e interfere nos sistemas de transporte de aminoácidos e fosfatos.

De acordo com PALENZUELA (s.d), outra consequência deste processo é o estado túrgido da célula pelo aumento da concentração interna de ânions, levando ao desencadeamento de um mecanismo de compensação de carga elétrica e obrigando a célula bacteriana a aumentar os níveis de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e ou de glutamato. Em decorrência disso, há maior incremento da força iônica intracelular e de turgidez. Estes eventos promovem aumento da pressão mecânica sobre a parede bacteriana e rompimento da célula.

Ácidos orgânicos têm papel predominante na redução de microrganismos como *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* sp. em rações e conseqüente redução de infecções subclínicas nas aves. Contribuem com o aumento da absorção de nutrientes e acentuam as potencialidades do sistema digestivo e imunitário (DIBNER & BUTTIN, 2002). Acrescentam-se a estas informações, as ponderações feitas por OSTERMANN et al. (2005), no que tange ao efeito antiinflamatório dos ácidos; havendo maior evidência dessa ação para os ácidos acético e propiônico.

GAUTHIER (2005) determinou o pH dos compartimentos do trato gastrointestinal de aves e o tempo de trânsito da ingesta em cada segmento, como fatores importantes para a observação da ação dos ácidos orgânicos.

Relatos de redução da contaminação de inglúvio e proventrículo, porções superiores do intestino, indicam que a diminuição do pH nesse segmento do trato gastrointestinal favorece o controle da microbiota intestinal, tanto de bactérias não-patogênicas quanto de patogênicas. IZAT et al. (1990) relataram redução da carga microbiana em intestino delgado e cloaca de aves alimentadas com rações contendo ácido propiônico.

Os benefícios dos ácidos orgânicos de modo geral vão além de sua atividade antimicrobiana; observa-se aumento da secreção pancreática e efeito positivo sobre a atividade da mucosa gastrointestinal. No entanto, HUME et al. (1993) verificaram que o ácido propiônico acrescentado a rações era metabolizado e absorvido em regiões como o inglúvio, moela e proventrículo,

antes de alcançar o intestino delgado ou ceco em quantidades suficientes para ocasionar a redução microbiana desejada.

OSTERMANN et al. (2005) alertaram que, em condições anormais, em períodos de baixa absorção de carboidratos ou de grande contaminação, os ácidos excedem a capacidade tamponante e absorviva aumentando em concentração. Isto possibilita acentuada redução do pH intestinal elevando a incidência de lesões na mucosa.

Em relação à aplicação de ácidos orgânicos em rações, deve-se destacar a indução de tolerância à acidificação observada no sorovar *Salmonella* Typhimurium em ambientes impróprios ao seu crescimento e permanência (KWON et al., 2000). RICKE (2003) constatou a sobrevivência deste sorovar em ambiente de anaerobiose e em prolongado período de exposição a pH 3,0 e observou que o sorovar é estimulado a aderir e invadir células quando exposto aos ácidos acético, propiônico, butírico ou associações deles, sendo o nível de resposta dependente da fase de crescimento, concentração e pH.

KWON & RICKE (1998) discutiram sobre a adaptação de alguns microrganismos às situações de diminuição de pH. Segundo os autores, esses mecanismos ainda não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que a diminuição do pH intracelular ativa a expressão de genes que codificam descarboxilases que podem elevar o pH interno, por catalisar reações que consomem prótons. Foram evidenciadas três reações de descarboxilação associadas a este fenômeno: transformação de glutamato em GABA, de arginina em agmatina e de lisina em cadaverina. Em todos os casos, há consumo de um próton para cada molécula de aminoácido. Os novos produtos formados são transportados mediante o mecanismo anti-porte com alto custo de energia para a célula.

As reações de descarboxilação de aminoácidos em pH ácido relacionam-se à queda de pH interno, fator este que desencadeia acúmulo de duas importantes proteínas reguladoras: *RpoS* e *PhoP*. Estas proteínas controlam distintos conjuntos de genes relacionados à proteção e reparação de macromoléculas. Portanto, *Salmonella* Typhimurium desenvolve mecanismo fisiológico de adaptação à ação antimicrobiana de ácidos orgânicos e esta resistência induzida é reforçada em anaerobiose, pH ácido e exposição prolongada aos ácidos (KWON & RICKE, 1998).

SAMARTZIDOU et al. (2003) concluíram que a resposta dos microrganismos em relação à sobrevivência ao ambiente de pH muito baixo, ou 3,6, por trinta minutos, deve-se ao fato de haver estímulo à excreção de cadaverina presente no interior celular.

Há mais de uma década, PENZ JÚNIOR et al. (1993) descreveram a aplicação de ácidos orgânicos na alimentação de aves como um assunto a ser discutido por nutricionistas e patologistas. Naquela época, o emprego de aditivos acidificantes era crescente no mundo, em virtude do efeito inibidor para enterobactérias e potencializador de ganhos nutricionais. É fato que, por mais de uma década, ainda há muita discussão sobre a ação destes ácidos como descontaminantes de rações (BLACK et al., 2006).

ALBUQUERQUE et al. (1998) destacaram a importância da inibição de desenvolvimento de microrganismos em rações pela adição de ácidos orgânicos ou ácidos graxos de cadeia curta, com reflexos na redução da ocorrência de infecções por salmonelas em frangos e em pintos, provenientes de matrizes alimentadas com rações tratadas pelos mencionados aditivos. No entanto, é difícil prever a interação decorrente entre o ácido e os componentes do alimento.

Por outro lado, SILVA (2006) sugeriu que o nível de contaminação das rações por *Salmonella* sp., assim como o sorotipo envolvido, devem ser considerados para que haja segurança na adoção deste tipo de tratamento.

Diante de tais considerações e da relevância do tema para o controle de *Salmonella* sp. na avicultura, objetivou-se avaliar: a) o tratamento químico de rações experimentalmente contaminadas, com três ácidos orgânicos isoladamente e em diferentes concentrações; b) o emprego destes aditivos químicos e sua interação com o desempenho de aves de corte.

## REFERÊNCIAS

1. ALBUQUERQUE, R., ITO, N. M. K., MIYAJI, C. I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bactericida e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella* spp. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 35, n.6, p.279-282, 1998 .
2. BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura – problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, n.1, p. 9-14, 1999.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A., Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-195.
4. BLACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J. A. Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais...** Chapecó: Embrapa Suínos e Aves, 2006. p. 95-103.
5. CHOCT, M. **Effects of Organic Acids, Prebiotics and Enzymes on Control of Necrotic Enteritis and Performance of Broiler Chickens**. University of New England Armidale, NSW. 2004. Disponível em [www.jcu.edu.au/school/bms/avpa/avpa\\_conf\\_apr\\_2002/abstracts/choct.pdf](http://www.jcu.edu.au/school/bms/avpa/avpa_conf_apr_2002/abstracts/choct.pdf) . Acesso em 23 de setembro de 2004.
6. 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.
7. GAUTHIER, R. Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoters in poultry. In: I FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA. Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu:ANIMALWORLD, 2005. p.148-157.
8. GONZALES, E. **Aditivos para rações de aves e suínos**. Botucatu: FMVZ-UNESP. 2002, 71p. (Apostila)
9. HENZEL, D. J.; OPITZ, H. M. Role of rodents in the epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and other *Salmonella* serovars in poultry farms. In: SAEED, A. M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control**. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 331-340.
10. HUME, M. E.; CORRIER, D. E.; IVIE, G. W.; DELOACH, J. R. Metabolism of C 14 propionic acid in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, p.786-793, 1993.

11. 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.
12. KLEIN, A. A. Pontos críticos do controle de qualidade em fábricas de ração – uma abordagem prática. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL ACAV – EMBRAPA SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, Concórdia. 1999. **Anais...** Concórdia:CNPSA-EMBRAPA, 1999. p.1-21.
13. KWON, Y. M.; RICKE, S. C. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p. 3458-3463, 1998.
14. KWON, Y. M.; PARK, S. Y.; BIRKHOLO, S. G.; RICKE, S. C. Induction of resistance of *Salmonella* Typhimurium to environmental stresses by exposure to short-chain fatty acids. **Journal of Food Science**. v.65, n.6, p.1037-1040, 2000.
15. 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, 2005. p.158-165.
16. NASCIMENTO, V. P.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; FALLAVENA, C. B.; CANAL, C. W.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; LEÃO, J. A.; PILOTTO, F., NEVES, N.; NASCIMENTO, L. P. Qualidade microbiológica e prevalência de *Salmonella* no processo de tratamento de efluentes de abatedouros avícolas. In: SIMPÓSIO SOBRE RESÍDUOS DA PRODUÇÃO AVÍCOLA, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Embrapa Suínos e Aves, 2000. p.52-62.
17. OLIVEIRA, G. **Avaliação de pontos críticos de contaminação por *Salmonella* sp. no processo da fabricação da farinha de vísceras, destinada à fabricação de rações para aves.** Porto Alegre. 1996. 64f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
18. OSTERMANN, D.; SANFELICE, A. M.; VIEIRA, S. L.; VIOLA, E. S. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. **Ave World**, Paulínia. Ano 3, n.15, p. 28-32, 2005.
19. PALENZUELA, P. R. Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos. In: XVI CURSO DE ESPECIALIZACIÓN FEDNA. Disponível em [www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00cap8.pdf](http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00cap8.pdf). Acesso em 02 de setembro de 2002. 16p.
20. PENZ JÚNIOR, A. M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 1993. p. 111-119.

21. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.** Goiânia, 2002. 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
22. RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v.82, p.632-639, 2003.
23. RYCHLIK, I.; BARROW, P. A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.1021-1040, 2005.
24. ROCHA, P. T. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em granjas de integrações de frangos de corte no Estado de Goiás.** Goiânia. 2001. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Goiás.
25. SALM-NET – CENTRO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium na Europa Ocidental, de 1993 a 1995: relatório da vigilância da Salm-Net. **Euro Surveill.** v.2, n.1, p.4-6, 1997. Disponível em [www.eurosurveillance.org/eurosurveillance/v2.n1](http://www.eurosurveillance.org/eurosurveillance/v2.n1). Acesso em 10 de janeiro de 2002.
26. SAMARTZIDOU, H.; MEHRAZIN, M.; XU, Z.; BENEDIK, M. J.; DELCOUR, A. H., Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. **Journal of Bacteriology**. v. 185, n.1, jan., p.13-19, 2003.
27. SILVA, P.L. Segurança alimentar e legislação na produção. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. Chapecó-SC. Embrapa Suínos e Aves. Abril, 2006. p. 34-40.

## CAPÍTULO 2 - ÁCIDO ACÉTICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS COM *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella* Typhimurium

**RESUMO:** Foi conduzido um experimento, utilizando-se duzentos pintos com um dia de idade. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições de dez pintos cada. A ração foi formulada a base de milho e farelo de soja, não utilizando produtos de origem animal ou conservantes. Esta ração foi contaminada experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium e tratada com ácido acético em cinco diferentes concentrações (0, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), no período de oito a vinte e um dias de idade. Foram analisados o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, assim como a eficiência do ácido em reduzir ou eliminar o patógeno das rações tratadas, nos diferentes níveis. Avaliou-se ainda a presença do agente nas excretas, suabes cloacais e *pool* de fígado, coração e vesícula biliar de uma ave de cada parcela experimental. Verificou-se que os níveis de ácido acético de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% favoreceram o ganho de peso e melhoraram a conversão alimentar mas não foram eficientes em eliminar ou reduzir *Salmonella* sp. em rações. Quanto à recuperação de *Salmonella* sp. de rações tratadas, observou-se que a concentração de 1,5% de ácido acético apresentou maior redução da contaminação. Registrou-se a ocorrência da bactéria em 50% dos *pool* de órgãos avaliados. Constatou-se que excretas e suabes cloacais apresentaram frequência de isolamento de 95% e 30%, respectivamente, para *Salmonella* sp. O ácido acético na concentração de 1,5% reduziu *Salmonella* sp.

**Palavras-chave:** Ácido orgânico, aves, contaminação bacteriana, desempenho, ração.

**ACETIC ACID FOR BROILER FED RATIONS EXPERIMENTALLY  
CONTAMINATED WITH *Salmonella* Enteritidis AND  
*Salmonella* Typhimurium**

**ABSTRACT:** An experiment was carried out with 200 day-old chicks. Birds were allotted in a completely randomized design with five treatments and four replications of 10 chicks each. Ration was based on corn-soybean, formulated according to nutritional requirements and without any kind of animal by-product or conservatives. This ration was experimentally contaminated with *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium and treated acetic acid in five different concentrations (0, 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) from eighth to 21 days of age. Weight gain, feed intake and feed-to-gain ratio and, simultaneously, to evaluate the efficiency of the acetic acid to reduce and/or eliminate the pathogen from experimental rations in the different acid levels supplemented. The presence of the bacteria was evaluated from cloacal swabs and pool liver, heart and gall bladder of one bird from each experimental replicate. The acetic acid levels of 0.5%, 1.0% 1.5% and 2.0% alter positively the weight gain and feed-to-gain ratio. When the *Salmonella* sp. recovering was analyzed in treated rations, the concentration of 1.5% acetic acid showed the highest reduction in bacterial contamination. Occurrence 50% of bacteria was obtained in the organs pool evaluated. In excreta and cloacal swabs, isolates frequency was 95 and 30%, respectively to *Salmonella* sp. Acetic acid at 1.5% concentration was effective to reduce *Salmonella* sp. contamination in ration.

**Key words:** Avian, bacterial contamination, organic acid, performance, ration.



## INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de frangos considera como risco para saúde pública a possibilidade de isolamento de bactérias patogênicas no ambiente avícola, em carcaças ou alimentos processados de origem aviária. Portanto, o controle de *Salmonella* sp. deve envolver todas as etapas de criação e processamento das aves (SONCINI, 2002).

FRANÇA (2005) esclareceu que entre os mecanismos adotados para controlar as salmonelas em carne de aves pelo governo brasileiro, foi concebido o Programa de Redução de Patógenos (PRP), implantado monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp em carcaças de frangos e perus. Ainda assim, o controle de salmonelas em carne de aves ou produtos de origem avícola, de modo geral, exige procedimentos de biossegurança bem fundamentados que devem ser rigorosamente seguidos. Dentre as principais fontes veiculadoras de infecção por salmonelas na avicultura, citam-se as rações.

Muitas medidas têm sido adotadas pelos fabricantes para a descontaminação de rações, objetivando o declínio do efeito negativo da contaminação sobre as aves e melhor desempenho das mesmas (GONZALES, 2004). A utilização de prebióticos e probióticos são possibilidades que permeiam o cenário avícola com a finalidade de preservar o estado sanitário das aves e também da população consumidora.

No que tange à utilização de antimicrobianos, sabe-se que doses subterapêuticas constituem o princípio dos promotores de crescimento para frangos, mas esta prática vem sendo criticada severamente (McMULLIN, 2004) e sofrendo restrições pelos principais mercados mundiais de carne avícola, desde o mês de janeiro de 2006.

Entre as salmonelas de maior preocupação mundial, enquadram-se *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, para as quais os estabelecimentos avícolas devem possuir certificado de granja livre ou controlada para esses sorovares (BRASIL, 2003). Esses patógenos têm sido freqüentemente reportados como presentes em carcaças de aves, no ambiente avícola, em matérias-primas de origem animal e vegetal destinadas à fabricação de rações para aves (SALM-NET, 1997; BARROW, 1999; NASCIMENTO et al., 2000; SESTI, 2004) confrontando-se com questões primordiais da segurança

alimentar. Os critérios microbiológicos do *Codex Alimentarius* preconizam a inocuidade dos alimentos.

A aplicação de aditivos de origem química em alimentos destinados a animais, ou acidificantes, tornou-se uma alternativa para a manutenção da boa qualidade das rações do ponto de vista microbiológico e com aceno de melhoria para o desempenho das aves (DIBNER & BUTTIN, 2002).

O ácido acético, ácido orgânico de cadeia curta, fraco, conhecido também como etanóico, possui fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , é empregado em alimentos como conservante alimentar. LE NY (2005) esclareceu que o ácido acético tem sido empregado na água de frangos submetidos à restrição alimentar, no período de oito horas que antecede ao abate. O principal objetivo é reduzir a carga de salmonelas do ingluvío e conseqüentemente das carcaças.

OSTERMANN et al. (2005) constataram que o efeito bactericida ou bacteriostático do ácido orgânico baseia-se na sua capacidade de difusão através da membrana semipermeável dos microrganismos e interiorização no citoplasma. Para que isto ocorra, o ácido deve estar em sua forma não-dissociada, ou seja, a eficiência antimicrobiana de um ácido depende da sua constante de dissociação ou pKa. O ácido acético possui pKa 4,76. Nesta faixa de pH há a dissociação de 50% do ácido.

No entanto, há discussão quanto à aplicação e efeito inibidor de ácido acético em avicultura. Também é notório que esse ácido comumente está associado a um ou mais ácidos orgânicos com o objetivo de potencialização do efeito de acidificação e descontaminação (ANDREATTI FILHO et al., 1997; ALBUQUERQUE et al., 1998).

Diante da relevância do tema, objetivou-se com o presente estudo verificar o efeito da aplicação de ácido acético isoladamente em rações experimentalmente contaminadas fornecidas as aves. Para tanto, avaliou-se a recuperação de *Salmonella* sp. em diferentes categorias de amostras provenientes de vinte parcelas experimentais, após a contaminação das rações com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium e o tratamento das mesmas com diferentes concentrações do ácido acético. Simultaneamente verificou-se o desempenho do lote no período de oito a vinte e um dias de idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local

O experimento foi conduzido no Isolamento do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG), de maio a junho de 2004.

As análises laboratoriais de isolamento e identificação bacteriana e biologia molecular foram conduzidas no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da UFG.

### Delineamento e Tratamentos

Foram alojados 200 pintos de um dia de idade, machos, de linhagem Cobb. As aves foram distribuídas em cinco tratamentos e quatro repetições de 10 pintos cada, em baterias aquecidas de aço galvanizado.

Inicialmente, os pintos foram pesados em grupos de dez para a composição das parcelas experimentais e distribuídos homoganeamente tendo como base o peso.

Os tratamentos foram caracterizados pela adição de ácido acético líquido, nos níveis de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% a uma ração contaminada por suspensão bacteriana de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, perfazendo cinco tratamentos, respectivamente.

A cada sete dias as aves das parcelas experimentais foram pesadas e a sobra de ração retirada, computada e descontada do total de ração fornecida. Calculou-se então o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar. Também foram anotados os óbitos durante o período de alojamento e descontados durante o período de alojamento.

Antes de ser fornecida a cada lote de pintos, a ração e a água foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* sp.. Os forros de caixa de transporte de pintos foram recolhidos e também submetidos à pesquisa do patógeno. Para todas as amostras, seguiu-se a metodologia descrita em BRASIL (1995).

## Alimentação das aves

A ração fornecida às aves foi formulada, a base de milho e soja, sendo preparada na fábrica da Escola de Veterinária e não havendo incorporação de ingredientes de origem animal ou aditivos. Para todos os tratamentos foi fornecido o mesmo nível de energia (3.122 kcal/kg), assim como o mesmo percentual de proteína (20,87%). Sua composição, para 100 kg, pode ser vista no Quadro 1.

**QUADRO 1.** Composição da ração fornecida a pintos de corte no período de 1 a 21 dias de idades .

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Milho	57,078
Farelo de soja	34,538
Óleo vegetal	4,534
Fosfato bicálcico	1,770
Calcário calcítico	1,028
DL-Met 99	0,219
L-Lis HCl	0,149
Sal	0,434
Suplemento vitamínico inicial	0,250
Total (%)	100
<b>Composição nutricional calculada (para 100 kg)</b>	
<b>Nutrientes</b>	<b>(%)</b>
EM (kcal/kg de ração)	3122
PB	20,877
Cálcio	0,939
Fósforo total	0,672
Fósforo disponível	0,441
Potássio	0,511
Sódio	0,216
Fibra	3,261
Gordura	6,679
Ácido linoleico	3,590
Metionina	0,538
Metionina + cistina	0,879
Lisina	1,239
Treonina	0,809
Triptofano	0,277

## Culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium

Culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, estocadas em ágar nutriente, isoladas de amostras de origem aviária foram

inoculadas, separadamente, em 10 mL de caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis (RV) e caldo selenito-cistina (SC) e incubadas por 24 horas a 42°C, para multiplicação do agente. Após este período, 0,03 µL foi transferido com auxílio de alça de níquel-cromo, por semeadura em estrias e esgotamento, em ágar Hektoen e ágar Rambach, incubados por 24 horas a 37°C. Ato contínuo, as unidades formadoras de colônias (UFC), tanto de *Salmonella* Enteritidis quanto de *Salmonella* Typhimurium, foram ressuspendidas, separadamente, em 1,0 mL de solução salina a 0,85%, pH 7,0. A suspensão concentrada de bactérias, em volume de 1,0 mL, baseou-se na escala de McFarland, em concentração de 10<sup>2</sup> UFC/mL, para cada sorovar.

De cada parcela experimental, 50 gramas de ração foram recolhidas, acondicionadas em sacos plásticos e contaminadas com 1,0 mL de suspensão de *Salmonella* Enteritidis e 1,0 mL de suspensão de *Salmonella* Typhimurium. A homogeneização ocorreu até a completa absorção do líquido pela ração. Em período posterior a uma hora, estas alíquotas foram incorporadas às respectivas rações, ocorrendo nova homogeneização.

Após 24 horas de contaminação experimental das rações, uma porção de 100 gramas de ração de cada parcela experimental foi recolhida em sacos plásticos individuais esterilizados, devidamente identificados, e encaminhados para pesquisa dos patógenos, conforme BRASIL (1995). As amostras negativas ao gênero *Salmonella* sp. ao isolamento bacteriológico foram analisadas pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), conforme BEJ et al. (1994).

### **Contaminação e tratamento das rações**

As rações contaminadas foram oferecidas às aves a partir do sétimo dia de alojamento, devido a adaptação na primeira semana de vida, com finalidade de permitir a observação de quaisquer anormalidades que pudessem comprometer o desenvolvimento normal do lote e/ou mascarar a contaminação experimental e/ou o tratamento químico.

Após pesagem das aves, uma porção de 200 gramas de ração, obtida de cada parcela experimental, foi contaminada com suspensão bacteriana de

*Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Estas porções foram homogeneizadas e incorporadas às rações.

Após 24 horas de contaminação, cada parcela teve uma amostra de 100 gramas de ração retirada para pesquisa de *Salmonella* sp.. Nesse momento, as rações foram acidificadas conforme cada tratamento e homogeneizadas.

Decorridas 24 horas de acidificação, o pH foi determinado por meio de homogeneização manual vigorosa por 30 minutos em 50 mL de água destilada. Após repouso por cinco minutos e procedeu-se a leitura em pHmetro digital.

### **Pesquisa de *Salmonella* sp. nas diferentes categorias de amostras**

A pesquisa de *Salmonella* obedeceu o preconizado por BRASIL (1995) e GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com modificações. Dentre as categorias de amostras citam-se:

- forro de caixa de transporte de pintos, duas amostras ;
- ração recém preparada, uma amostra;
- ração não contaminada fornecida às aves durante a primeira semana, 20 amostras;
- ração contaminada fornecida às aves logo após o sétimo dia de vida, 20 amostras;
- *pool* de coração, fígado e vesícula biliar de uma ave, 20 amostras;
- excreta final aos 21 dias de vida, 20 amostras;
- suabe cloacal de uma ave, 20 amostras.

Finalizado o experimento, aos 21 dias de idade, uma ave de cada grupo foi sacrificada, identificada e analisada com vistas à presença de lesões anatomopatológicas e pesquisa de *Salmonella* sp. nos órgãos de eleição ou *pool* de coração e fígado associado à vesícula biliar.

### **Isolamento e identificação de *Salmonella* sp. pela técnica bacteriológica convencional**

Os forros de caixa foram identificados, cortados com tesouras esterilizadas, raspados com colheres esterilizadas e as amostras aliqüotadas em sacos plásticos esterilizados. Foram distribuídos dois gramas da amostra em 20

mL de água peptonada tamponada (APT) a 1%, a 37°C por 24 horas. Em seguida, procedeu-se o enriquecimento seletivo inoculando 1,0 e 0,1 mL, respectivamente, em 10 mL de caldos selenito-cistina (SC) e Rappaport-Vassiliadis (RV), incubando a 42°C por igual período de tempo.

Em relação às rações, após homogeneização da amostra de 100 gramas, transferiu-se 25 gramas para caldo de pré-enriquecimento constituído de 225 mL de água peptonada tamponada (APT) a 1% e incubou-se a 37°C, por 24 horas. Após este período, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram transferidas para 10 mL de SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

Amostras compostas por órgãos foram trituradas, homogeneizadas e fracionadas em unidades de 1,0 e 0,1 grama. A seguir, foram transferidas para 10 mL dos caldos SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

Os suabes cloacais foram transportados embebidos em água peptonada tamponada a 0,1% e submetidos ao pré-enriquecimento em 10 mL de APT a 1,0%, a 37°C por 24 horas. Ato contínuo, 1,0 e 0,1 mL de APT a 1,0% foram transferidos para 10 mL de SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

As excretas foram homogeneizadas e transferidas unidades analíticas de 1,0 e 0,1 grama para 10 mL dos caldos SC e RV, respectivamente. A incubação procedeu-se a 42°C, por 24 horas.

Finalizado o período de incubação dos caldos, uma alíquota de 0,03 µL de cada caldo foi transferida com auxílio de alça de níquel-cromo calibrada, para placas de Petri contendo ágar MacConkey (MC) e ágar Hektoen (HK). Procedeu-se à semeadura em superfície por esgotamento em estrias. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Finalizado este período, de cinco a oito unidades formadoras de colônias (UFC) sugestivas de pertencerem ao gênero *Salmonella* foram repicadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubadas a 37°C, por 18 horas. Quando o número de UFC era inferior a cinco, todas as colônias eram pescadas e submetidas ao mesmo procedimento.

As culturas em ágar TSI com reações compatíveis para o gênero *Salmonella* sp. foram identificadas bioquimicamente. As provas bioquímicas foram incubadas a a 37°C por até sete dias, com leituras diárias.

Das culturas bioquimicamente confirmadas como *Salmonella* sp. foi realizada a prova sorológica com soros polivalentes anti-O e anti-H, realizados a

partir de culturas jovens de 18 horas de incubação em ágar nutriente e ressuspensas em solução salina 0,85%. Após a confirmação sorológica, foram estocadas em ágar nutriente e enviadas ao Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ) para tipagem sorológica.

### Recuperação bacteriana das rações tratadas quimicamente

As rações tratadas com as diferentes concentrações do ácido acético foram recolhidas 24 horas após a acidificação. De cada parcela, foram retirados 100 gramas e acondicionados em sacos plásticos esterilizados, identificados individualmente, e posteriormente lacrados. Foram homogeneizados 10 gramas em 90 mL de APT a 1,0%. A partir desta diluição e empregando solução salina 0,85%, foram preparadas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . De cada diluição, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada em superfície em placas de ágar Rambach e incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura das placas baseou-se na diferenciação entre as UFC's de *Salmonella* e outros gêneros conforme GRUENEWALD et al., (1991) e ALBUQUERQUE et al., (1998).

Nas diferentes concentrações do ácido e das quatro repetições foram obtidas quatro diluições seriadas para enumerar o patógeno cujos resultados foram transformados em escores, conforme contagem em placa de Petri de 65 cm<sup>2</sup> (Tabela 1).

**TABELA 1.** Escore de crescimento de *Salmonella* sp. em rações avícolas experimentalmente contaminadas e tratadas quimicamente com ácido acético.

Escore	Observações efetuadas
0	Ausência de crescimento
1	1 a 100 UFC/placa
2	10 a 25 UFC/ cm <sup>2</sup> de placa
3	25 a 100 UFC/ cm <sup>2</sup> de placa
4	Número incontável de UFC, com alteração da coloração do meio

Adaptado de ALBUQUERQUE et al. (1998).



### **Detecção de *Salmonella* sp. pela técnica de PCR**

As amostras negativas para *Salmonella* sp. analisadas pela técnica bacteriológica convencional foram submetidas à detecção do gênero pela técnica de PCR. Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL das culturas nos caldos SC e RV, de todas as amostras cultivadas e acondicionadas em tubos de polipropileno e estocadas a -18°C, para uso posterior.

O DNA genômico foi extraído apenas do caldo SC, uma vez que este apresentou maior eficiência no isolamento bacteriano.

Após descongelamento, os tubos foram centrifugados a 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 567 µL de tampão Tris-EDTA (TE), pH 8,0. A lise foi realizada com 30 µL de dodecyl sulfato de sódio (SDS) a 10%, seguindo-se homogeneização vigorosa e incubação a 37°C por uma hora em banho-Maria. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de NaCl a 5M. Após homogeneização vigorosa foram adicionados 80 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) a 10%, pré-aquecido a 65°C. Homogeneizou-se vigorosamente e incubou-se a 65°C por 10 minutos. À solução anterior, adicionou-se 700 µL em igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C (AUSUBELL et al., 1993).

O sobrenadante foi transferido para novo tubo, igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado e a centrifugação realizada conforme já descrito. Este procedimento foi repetido até o desaparecimento completo da interface esbranquiçada. Uma vez finalizada a purificação a precipitação do DNA foi realizada com o uso de etanol PA gelado, na proporção de 2 a 3 vezes o volume do sobrenadante e incubação a -18°C por 24 horas.

Finalizado este período, seguiu-se centrifugação a 10.000 rpm a durante 10 minutos. O álcool foi descartado vertendo-se o tubo cuidadosamente para que não houvesse descarte do DNA. Os tubos foram novamente acrescidos de etanol PA, submetidos a -18°C por 20 horas.

Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente e nova precipitação realizada conforme descrito. Uma vez centrifugadas, as amostras foram tratadas com álcool 70% gelado. O álcool foi

descartado e o *pellet* seco ao ar. O DNA foi ressuspendido ou hidratado com tampão TE, pH 8,0.

A determinação da concentração de DNA do material extraído foi realizada por eletroforese, em gel de agarose.

Para a amplificação, 5,0 µL da amostra extraída foi incorporada aos reagentes da reação. Para tanto, foram utilizadas as concentrações de 50 mM TrisCl (pH 8,9), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP's, 0,5 µM dos *primers* SHIMA – L e SHIMA – R (BEJ et al, 1994); água milli-Q; 2,5 U de Taq polimerase. O *primer* SHIMA-L tem a descrição (5'-CGT-GCTCTGGAAAACGGTGAG-3') e o SHIMA-R 5'-CGTGCTGTAATAGGAATATCTTCA-3'.

O produto desta mistura para amplificação foi submetido a 35 ciclos de amplificação com desnaturação por 3 minutos a 94°C; 35 ciclos compostos por três etapas de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C e 30 segundos a 72°C. Uma etapa final de todo o ciclo de amplificação de 3 minutos a 72°C, sendo a extensão final conforme preconizado por BEJ et al. (1994). A amplicon desta reação apresenta 122 pares de base.

Foram utilizados controles positivos formados por culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Os controles negativos utilizados foram o complexo da reação sem *primer*. Dos produtos do PCR ou amplicons foi retirada uma alíquota de 10 µL para a eletroforese em gel de agarose a 1,0% em TBE durante 40 minutos a 9 V/cm. Após coloração do gel com brometo de etídeo, procedeu-se a observação em transiluminador de luz ultravioleta (BEJ et al., 1994).

### **Avaliação de desempenho**

Todas as aves e rações das parcelas experimentais foram pesadas no primeiro, sétimo, 14<sup>º</sup> e 21<sup>º</sup> dias de vida. Em caso de morte, o peso da ave foi registrado para posterior correção do peso final da parcela, bem como do consumo de ração e da conversão alimentar.

O peso final foi obtido pelas médias das parcelas. O consumo de ração calculado pela diferença entre a quantidade de ração fornecida, sobras e amostras retiradas, e a conversão alimentar pela relação entre o consumo e o

ganho de peso. Para a avaliação das variáveis considerou-se o período de 8 a 21 dias de idade, ocasião em que ocorreu a contaminação e acidificação das rações, respectivamente.

### **Análises estatísticas**

Os dados referentes ao desempenho foram submetidos à análise de regressão polinomial pelo programa UFV/SAEG (2001), versão 9.0. A análise dos dados de isolamento e recuperação de *Salmonella* sp. baseou-se na frequência de observação do patógeno e na estimativa de *escores*, respectivamente.

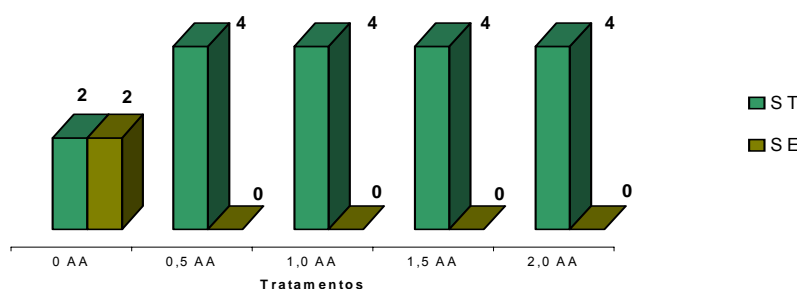
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes à detecção de *Salmonella* sp. em diferentes fontes, pelas técnicas de isolamento bacteriano convencional (IBC) e reação em cadeia pela polimerase (PCR), em fase anterior ao alojamento dos pintos. Somente foram analisadas pelo PCR amostras negativas ao ICB.

**TABELA 2.** *Salmonella* sp. em fontes avaliadas anteriormente ao alojamento das aves.

Fonte	Isolamento bacteriano convencional	PCR
forro de caixa de transporte de pintos	0/1	0/1
ração recém preparada	0/1	0/1
ração não contaminada	0/20	0/20
Positivas/total	0/22	0/22
(%) negativas	100	100

Quanto à contaminação experimental da ração, pode-se afirmar que todas os tratamentos foram positivos para *Salmonella* sp.. Houve 100% de contaminação, sendo isolados somente os sorovares *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (ST). No entanto, é importante ressaltar que *Salmonella* Enteritidis (SE) foi isolada somente em duas parcelas experimentais e *Salmonella* Typhimurium (ST) em 18, das rações contaminadas experimentalmente e não tratadas, como pode ser visto na Figura 1.



**FIGURA 1.** *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST) em ração contaminada experimentalmente nas vinte parcelas experimentais sem adição de ácido acético (AA).

É possível que a ausência de SE, nas demais parcelas experimentais, seja explicada pela possibilidade de SE ser mais suscetível à ação dos componentes lipídicos presentes na ração; explicação esta que pode ser ampliada no que tange à menor possibilidade de adaptação do sorovar ao ambiente com baixa atividade de água e maior percentual de óleos.

Observando a Tabela 3, nota-se que em excretas submetidas à análise bacteriológica convencional, 75%, 75%, 75%, 100% e 0% corresponderam aos níveis de ácido acético de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%, respectivamente. Porém, ao empregar a técnica de PCR para amostras negativas ao isolamento bacteriano convencional, anteriormente executado, observou-se positividade de 100%, 100%, 100% e 75% para os níveis de 0, 0,5, 1,0 e 2,0% respectivamente; sendo que do nível de 1,5% de ácido não houve análise realizada.

**TABELA 3.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) de excretas de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Excretas					Total Positivas (IBC e PCR)
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	
0 % de AA	3/4	75	ST*	1/1	100	100
0,5% de AA	3/4	75	ST	1/1	100	100
1,0% de AA	3/4	75	ST	1/1	100	100
1,5% de AA	4/4	100	ST	NR	NR	100
2,0% de AA	0/4	0	-	3/4	75	75
<b>Total</b>	13/20	65		6/7	85,7	95

\* - *Salmonella* Typhimurium

NR – não realizada a técnica de PCR.

Quanto ao padrão de apresentação do resultado para PCR, pode-se observar na Figura 2, controle positivo, negativo e reação positiva e negativa de amostras analisadas, assim como a ocorrência de algumas reações inespecíficas. Este fato, pode ser explicado pelo alto grau de contaminação de fontes como excretas e suabes cloacais, pelo alto grau de concentração de DNA e, parcialmente, tendo como base os achados de CHEN et al. (2000), que avaliando a especificidade do *primer* SHIMA, empregado no presente estudo, observaram reações de pouca especificidade para *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae*, mas que promoviam formação de bandas em região próxima à de 122 pares de

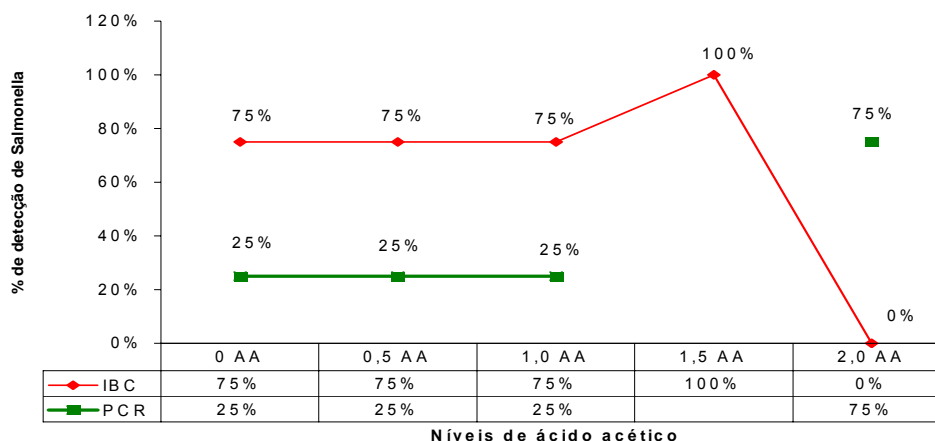
bases. É provável que esses agentes estivessem presentes nas amostras analisadas, no entanto, não foram pesquisados pelo IBC nas diferentes fontes.

Observa-se também resultados positivos revelando similaridade aos achados de BEJ et al. (1994) quanto à aplicação deste *primer* para diversos sorovares de *Salmonella* sp..



**FIGURA 2.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Na canaleta 1 está o padrão de peso molecular (DNA ladder 100pb). Na canaleta 2 está o controle positivo de *Salmonella* (*Salmonella* Typhimurium isolada de carcaça de frango). Canaleta 3 está outro controle positivo (*Salmonella* Enteritidis isolada de carcaça de frango). Nas canaletas 5 e 14 encontram-se os controles negativos, nas canaletas (4, 6, 7, 8 e 9) encontram-se amostras positivas e nas demais canaletas (10, 11, 12 e 13) encontram-se amostras negativas.

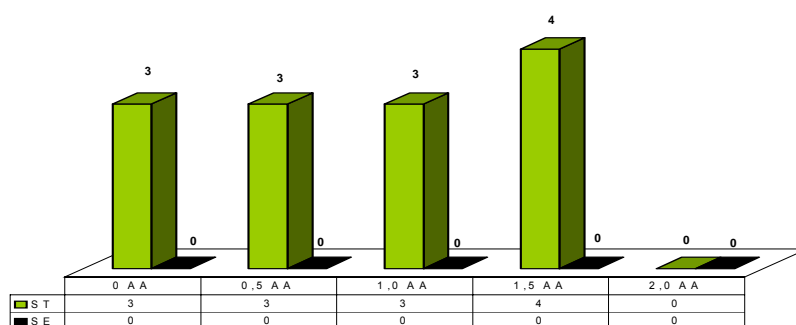
A complementariedade entre os resultados das duas técnicas, pode ser observada na Figura 3 e correlaciona-se aos achados de OLIVEIRA et al. (2004). Esses autores verificaram que o PCR detectou mais amostras positivas para *Salmonella* sp. que a técnica de isolamento bacteriano convencional.



**FIGURA 3.** Detecção de *Salmonella* sp. por IBC e PCR em excretas de frangos, com 21 dias de idade, alimentados com os níveis de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% de ácido acético.

No presente estudo, submeteu-se ao PCR somente amostras negativas ao isolamento bacteriano convencional. No entanto, pode-se afirmar que os resultados positivos ao PCR estão relacionados às bactérias que não foram capazes de suplantar o estado sub-letal ou de injúria, causado pelo ácido, e conseqüentemente não se desenvolveram em meios convencionais de cultivo microbiológico, mesmo tendo sido fornecido os nutrientes requeridos ao seu metabolismo. Vale salientar que no nível de 1,5% de ácido acético, não houve amostra analisada pela técnica de PCR, uma vez que ocorreu 100% de positividade para o IBC.

A Figura 4 apresenta o percentual de isolamento de *Salmonella* Typhimurium, pela técnica de IBC, das excretas das aves dos cinco tratamentos. Observa-se que para os níveis 0, 0,5 e 1,0% de ácido acético proporcionaram 75% de isolamento, indicando que em três das quatro repetições avaliadas o agente estava presente. Em relação ao nível 1,5% de ácido acético, nota-se que todas as repetições apresentaram isolamento para o patógeno, o que pode ser considerado relevante quanto à ineficiência do ácido em eliminar a bactéria nesta concentração e, por conseqüência, a perpetuação da contaminação ambiental (Van IMMERSEEL et al., 2005).



**FIGURA 4.** Detecção de *Salmonella Typhimurium* (ST) e *Salmonella Enteritidis* (SE) por ICB em excretas de frangos, com 21 dias de idade, alimentados com ração contaminada experimentalmente e tratada com níveis crescentes de ácido acético.

Ainda, quanto à Figura 4, pode-se considerar que os níveis de ácido acético de 0,5, 1,0 e 1,5% incorporados à ração não inibiram a excreção de salmonelas na fase inicial de vida assemelhando-se aos relatos de (Van IMMENSEL et al., 2004; 2006) quando relacionaram maior invasão de células epiteliais do intestino com o emprego do ácido acético na descontaminação da ração.

Considerando que a coleta destas amostras ocorreu aos 21 dias de idade das aves, é possível que tenha ocorrido este percentual de isolamento pela pouca eficiência do ácido para a redução ou eliminação de salmonelas e também pela sua menor eficiência à medida que o processo de produção afastou-se do dia de tratamento, tomando-se por base as descrições de PENZ JÚNIOR et al. (1993) quando apontaram resultados de pesquisadores sobre o maior percentual de reisolamento de salmonelas para ácido que não tenha apresentado completa redução do agente.

Na concentração de 2,0%, verifica-se ausência do agente nas excretas. Este resultado sugere que o ácido acético nesta concentração tenha sido eficiente em eliminar o agente no trato gastrointestinal das aves, divergindo parcialmente das descrições de SCHWARZER (2005), quando relatou que concentrações superiores a 0,5% de ácido acético adicionado em rações determinam maior invasão celular das células pelas salmonelas e, conseqüentemente, maior excreção fecal.

Analisando o isolamento dos sorovares ST e SE das excretas das aves observa-se que SE não foi identificada em nenhum tratamento, como pode ser



visto na Figura 4. Torna-se importante salientar, que este resultado deve ser associado àquele encontrado em ração contaminada não tratada, pois verifica-se que o sorovar SE foi identificado somente no grupo controle nesta fonte; o que permite afirmar a possibilidade de não estar presente nos demais tratamentos e, portanto, não ter sido isolado.

Ainda, considerando que o ácido acético é capaz de determinar diferentes graus de injúria celular subletal em cepas de *Salmonella* Enteritidis (ALEXANDROU et al., 1995), esta pode ser uma das causas prováveis da não detecção deste sorovar, neste caso. Provavelmente esta injúria poderia ter sido revertida com o uso de outros caldos nutrientes como, caldo infusão de cérebro-coração, BHI, ao invés dos caldos seletivos utilizados. Também poderia ter sido adotado o procedimento de período de incubação maior que os estabelecidos nos protocolos de isolamento para as fases de pré-enriquecimento; procedimento não adotado neste estudo.

No entanto, *Salmonella* Typhimurium foi isolada em todos os tratamentos, num total de 65% das amostras analisadas. Estes resultados são compatíveis com as características de sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium em rações com adição de ácidos orgânicos descritas por KWON et al. (2000). Assemelham-se também às constatações de RICKE (2003), quando destacou a sobrevivência deste sorovar em ambiente de anaerobiose e em prolongado período de exposição a pH 3,0. Este autor observou que o sorovar é estimulado a aderir e invadir células quando exposto ao ácido acético, sendo o nível de resposta dependente da fase de crescimento da bactéria, concentração e pH.

Esses resultados também são respaldados pelos relatos de GREENACRE et al. (2003), quanto à máxima adaptação e tolerância da ST proporcionado pelo ácido acético, em temperatura de 20°C. Ainda, a respeito da tolerância da *Salmonella* Typhimurium aos ácidos orgânicos, KWON & RICKE (1998) verificaram que esse sorovar apresenta esta característica frente aos ácidos orgânicos, tanto no trato gastrointestinal das aves como em rações tratadas e que estes ácidos podem contribuir para o aumento da virulência do patógeno.

A Tabela 4 apresenta os resultados referentes aos *pools* de órgãos para as técnicas de IBC e PCR. Nota-se que em nenhuma análise para IBC foi identificado o agente. Porém, tomando-se a técnica de PCR, observou-se que em

todos os tratamentos, 50% das amostras apresentaram reação positiva para *Salmonella* sp..

**TABELA 4.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) para *pool* de coração, fígado e vesícula biliar de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Pool de órgãos					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e/ou PCR)
0 % de AA	0/4	0	-	2/4	50	50
0,5% de AA	0/4	0	-	2/4	50	50
1,0% de AA	0/4	0	-	2/4	50	50
1,5% de AA	0/4	0	-	2/4	50	50
2,0% de AA	0/4	0	-	2/4	50	50
<b>Total</b>	0/20	0		10/20	50	50

Ao analisar os dados referentes aos órgãos, nota-se que a técnica de PCR foi mais eficiente em detectar o agente. Assim, parece lícito admitir que o patógeno pode estar presente em pequeno número de células aptas a desenvolverem uma contaminação detectável ao exame bacteriológico. Ressalta-se que todos os órgãos colhidos para análise (coração, fígado e vesícula biliar) não apresentavam sinais macroscópicos de salmonelose aviária ao exame de necropsia; não havendo, portanto, constatação de processo infeccioso, o que não descarta a possibilidade do mesmo encontrar-se em fase inicial. Nesse sentido, os resultados obtidos pela reação em cadeia da polimerase podem ser justificados pela alta sensibilidade da técnica a baixo número de UFC's e na baixa concentração de DNA (STONE et al., 1994; STONE et al., 1995; PONTES, 1999; SANTOS et al., 2001).

Os resultados referentes aos suabes cloacais podem ser visualizados na Tabela 5. Verifica-se que *Salmonella* sp. esteve presente em 100% das aves alimentadas com ração sem adição de ácido, e em 50% na ração tratada com 0,5% de ácido acético. Interrelacionando estes resultados àqueles encontrados em excretas, observa-se que em suabes de cloaca deveriam apresentar semelhança quanto à maior presença do agente. No entanto, é possível que a não identificação do agente restrinja-se ao fato do suabe ser expressão de um único indivíduo e não de um *pool* dos 10 pintos alojados em cada repetição dos

tratamentos preconizados. Também é possível que a eliminação do agente possa ter sido intermitente, não se podendo afirmar que o agente foi totalmente eliminado frente aos tratamentos.

**TABELA 5.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) para suabes cloacais de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Suabes cloacais					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e/ou PCR)
0 % de AA	0/4	0	-	4/4	100	100
0,5% de AA	1/4	25	ST*	1/3	33,33	50
1,0% de AA	0/4	0	-	0/4	0	0
1,5% de AA	0/4	0	-	0/4	0	0
2,0% de AA	0/4	0	-	0/4	0	0
<b>Total</b>	1/20	5		5/19	26,32	30

\* - *Salmonella* Typhimurium

O grau de dissociação do ácido acético em pH 6,0 é de 95% (LE NY, 2005). Tendo em vista os valores de pH das rações após a adição do ácido acético, apresentados na Tabela 6, pode-se afirmar que o ácido acético encontrava-se em valor inferior a 5% da forma não-dissociada ou forma capaz de interferir nos processos biológicos das células bacterianas. Este percentual não confere ao ácido a eficiência satisfatória na redução ou eliminação bacteriana, conforme as ponderações de PALENZUELA (s.d), pois nestas faixas de pH o gênero *Salmonella* sobrevive bem.

**TABELA 6.** Valores de pH das rações no período de 24 horas após a adição de ácido acético (AA) em suas diferentes concentrações.

Bateria 1	pH	Bateria 2	pH	Bateria 3	pH	Bateria 4	pH	Médias de pH
0% AA	6,9	0% AA	7,1	0% AA	6,9	0% AA	6,9	<b>6,95</b>
0,5% AA	6,8	0,5% AA	6,7	0,5% AA	6,8	0,5% AA	6,7	<b>6,75</b>
1,0% AA	6,6	1,0% AA	6,7	1,0% AA	6,7	1,0% AA	6,8	<b>6,68</b>
1,5% AA	6,6	1,5% AA	6,5	1,5% AA	6,5	1,5% AA	6,6	<b>6,55</b>
2,0% AA	6,5	2,0% AA	6,5	2,0% AA	6,5	2,0% AA	6,5	<b>6,50</b>

LE NY (2005) relatou que em pH 6,0 a concentração inibitória mínima (CIM) de ácido acético para *Salmonella* sp. requer um valor aproximado de 0,05% sendo importante avaliar a composição da ração, pois a presença do farelo de soja confere alta capacidade tamponante o que prejudica a acidificação da ração. Esse relato pode ser aplicado ao presente estudo, pois a ração das aves foi formulada a base de milho e farelo de soja e as determinações de pH revelam para todos os tratamentos valores superiores a 6,5.

Analisando os dados contidos na Tabela 7, observa-se que o ácido acético mostrou-se ineficiente para a eliminação de salmonelas, pois em todos tratamentos houve crescimento do agente.

**TABELA 7.** Escore de *Salmonella* sp. nas quatro diluições de amostras de ração contaminada e tratada com níveis crescentes de ácido acético (AA).

Tratamento		Escore de <i>Salmonella</i> sp. para as quatro repetições			
		Diluições das quatro repetições de cada tratamento			
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
0% de AA	R1	4	4	1	0
	R2	4	2	1	0
	R3	2	1	1	1
	R4	4	1	1	1
0,5% de AA	R1	2	2	0	0
	R2	4	3	1	0
	R3	4	1	1	0
	R4	3	1	0	0
1,0% de AA	R1	1	0	1	0
	R2	1	1	0	0
	R3	1	1	0	0
	R4	0	0	0	0
1,5% de AA	R1	1	1	1	1
	R2	0	0	1	1
	R3	1	0	0	0
	R4	1	0	0	0
2,0% de AA	R1	4	3	2	2
	R2	0	0	0	0
	R3	2	1	1	1
	R4	2	1	0	0

R - repetição dos tratamentos

$10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  correspondem às diluições seriadas

Legenda do escore de crescimento bacteriano:

0 = ausência de crescimento; 1 = 1 a 100 UFC por placa; 2 = 10 a 25 UFC por centímetro quadrado da placa; 3 = 25 a 100 UFC por centímetro quadrado da placa e 4 = número incontável de UFC, com alteração da coloração do meio.

Esta constatação está em consonância com os resultados do presente ensaio, principalmente se são considerados os relatos de DIBNER & BUTTIN (2002) no tocante à eficácia bactericida de ácidos orgânicos. Para estes autores o efeito bactericida do ácido orgânico é um fator relativo ao local de ação, ao pH do ambiente em que se encontram, à heterogeneidade bacteriana do ambiente avaliado, à capacidade tamponante dos ingredientes da ração e à concentração inibitória mínima do ácido.

Verifica-se ainda, que nas quatro repetições, o ácido acético pode ser considerado eficiente na redução de *Salmonella* sp. nas concentrações de 1,0 e 1,5% na ração, uma vez que a frequência de recuperação de *Salmonella* sp. mostrou-se menor. GONZALES (2004), FERREIRA & FERREIRA (2006) relataram que a ação de ácidos orgânicos é variável, no entanto, ressaltaram que os estudos baseiam-se em associação de dois ou mais ácidos, situação diferentes deste experimento. Estas descrições correlacionam-se às observações de ANDREATTI FILHO et al. (1997) quando observaram pequena eficiência na redução ou eliminação de *Salmonella* sp. pelo ácido acético na concentração de 0,9% e de ALBUQUERQUE et al. (1998) ao constatarem que ácidos orgânicos apresentaram comportamento irregular quando adicionados a rações e verificaram que a atividade bactericida destes ácidos não foi satisfatória em misturas secas, ocorrendo o oposto para veículo aquoso.

No presente ensaio, observou-se também que concentrações de 0,5 e 2,0% de ácido acético não mostraram resultados satisfatórios para redução ou eliminação de salmonelas, 24 horas após o tratamento. Nesse aspecto, estes resultados concordam com BYRD et al. (2001) que ao avaliarem a ação bactericida do ácido acético a 0,5% também não obtiveram êxito na eliminação ou redução de *Salmonella* sp..

Este fato, provavelmente pode ser explicado tendo como suporte os relatos de VAN IMMERSEEL et al. (2004). Esses autores verificaram que a utilização de ácido acético para o tratamento de *Salmonella* sp. aumentou sua invasão celular, não sendo, portanto eficiente sua aplicação.

Os resultados referentes ao desempenho das aves, no período de 8 a 21 dias de idade, estão apresentados na Tabela 8.

**TABELA 8.** Peso inicial (PI), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), peso final (PF) e conversão alimentar (CA) de frangos alimentados com rações contaminadas experimentalmente por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium contendo níveis crescentes de ácido acético (AA), período de 8 a 21 dias de idade.

Nível de AA	PI	CR	GP	PF	CA
0	249	983	753	1002	1,31
0,5%	243	960	760	1003	1,26
1,0%	222	965	767	989	1,25
1,5%	222	990	801	1023	1,24
2,0%	225	975	818	1043	1,19
Efeito*	ns	ns	L	Q	L
R <sup>2</sup>	-	-	0,78	0,89	0,85
Probabilidade	>0,5	>0,5	0,02	0,02	0,03
CV (%)	12,3	2,5	4,8	2,8	4,5

GP: L – efeito linear positivo ( $Y = 731,9 + 40,5x$ )

PF: Q – efeito quadrático ( $Y = 996,4 - 4,728x + 3,7x^2$ )

CA: L – efeito linear negativo ( $Y = 1,336 - 0,064x$ )

ns: não significativo

Não houve diferença significativa para peso inicial e consumo de ração.

Para ganho de peso, observou-se efeito linear positivo ( $Y = 731,9 + 40,5x$ ). O maior ganho de peso relacionou-se ao nível de 2,0% de ácido ou nível máximo testado no presente experimento. Isto sugere a possibilidade de que os níveis crescentes testados favoreceram a absorção de nutrientes pelas aves.

Quanto ao peso final, observou-se efeito quadrático para os níveis de ácido acético testados na ração. A derivação da equação quadrática  $Y = 996,4 - 4,728x + 3,7x^2$  resultou em um ponto de mínima de peso final para o nível de 0,639% de ácido acético incorporado à ração. Pode-se verificar que níveis de 1,5% e 2,0% de ácido acético favoreceram positivamente o peso final das aves para o período de 8 a 21 dias de idade.

Para a conversão alimentar houve efeito linear negativo ( $Y = 1,336 - 0,064x$ ). Tais resultados representam que a melhor conversão alimentar relacionou-se ao nível de 2,0% de ácido acético incorporado à ração e a pior para o grupo de aves alimentadas com ração contaminada e sem adição de ácido.

## CONCLUSÕES

1. Níveis crescentes de ácido acético (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%) favoreceram o ganho de peso e melhoraram a conversão alimentar mas não foram eficientes em eliminar ou reduzir *Salmonella* spp. em rações;
2. Ocorreu redução da contaminação de rações tratadas com 1,5% de ácido acético;
3. Ácido acético nos níveis avaliados e nas condições experimentais do presente estudo, não demonstrou eficácia para eliminação de *Salmonella* sp. em rações.

## REFERÊNCIAS

1. ALBUQUERQUE, R., ITO, N. M. K., MIYAJI, C. I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bactericida e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella* spp. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 35, n.6, p.279-282, 1998 .
2. ALEXANDROU, O.; BLACKBURN, C. W.; ADAMS, M. R. Capacitance measurement to assess acid-induced injury to *Salmonella enteritidis* PT4. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p.27-36, 1995.
3. ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.6, p.661-672, 1997.
4. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SMITH, J.A., SIDEMAN, J.G., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley e Sons, Inc, New York: p.18-21, 1987.
5. BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura – problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, n.1, p. 9-14, 1999.
6. BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H.; BOYCE, M. J.; ATLAS, R. M. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p.-368-373, 1994.
7. BRASIL. Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*)**. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Brasília, n.212, p.17694-17698, de 06 de novembro. Seção I, 1995.
8. BRASIL. Instrução Normativa Número 78. De 03 de novembro de 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normas Técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e livres ou controlados para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Brasília, p.3, de 05 de novembro. Seção I, 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. CHEN, W.; MARTINEZ, G.; MULCHANDANI, A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. **Analytical Biochemistry**, v. 280, p.166-172, 2000.
11. 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.
12. FERREIRA, A. P.; FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2006 Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p.56-69, 2006.
13. FRANÇA, J. M. Adequações dos programas de garantia de qualidade ao processamento de carnes de frango para mercados importadores. In: V SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS. 2005, Florianópolis. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p.19-31, 2005.
14. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of Salmonella in the poultry and poultry environments**. Oakwood, 1997. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p. [Workshop].
15. GONZALES, E. **Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares**. In: CURSO DE FISIOLOGIA DA DIGESTÃO E METABOLISMO DOS NUTRIENTES EM AVES. 2004. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP DE JABOTICABAL. Jaboticabal, SP. 56p. 2004.
16. GREENACRE, E. J.; BROCKLEHURST, T. F.; WASPE, C.R.; WILSON, D.R.; WILSON, P. D. G. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20°C: optimization and modeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.7, p.3945-3951, 2003.
17. GRUENEWALD, R.; HENDERSON, R. W.; YAPPOW, S. Use of rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.10, p.2354-2356, 1991.
18. KWON, Y. M.; RICKE, S. C. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p. 3458-3463, 1998.
19. KWON, Y. M.; PARK, S. Y.; BIRKHOLO, S. G.; RICKE, S. C. Induction of resistance of *Salmonella* Typhimurium to environmental stresses by exposure to short-chain fatty acids. **Journal of Food Science**. v.65, n.6, p.1037-1040, 2000.
20. 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, 2005. p.158-165.

21. McMULLIN, P. Produção avícola sem antibióticos: riscos potenciais de contaminação cruzada e de detecção de resíduos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 2004. **Anais volume 2...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.211-226, 2004.
22. OLIVEIRA, S. D.; BRANDELLI, A.; CANAL, C.W. Detecção de *Salmonella* sp. e caracterização de isolados de *Salmonella* Enteritidis pela presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e rep-PCR Fingerprinting. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.2, p.157-158, 2004.
23. OSTERMANN, D.; SANFELICE, A. M.; VIEIRA, S. L.; VIOLA, E. S. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. In: AVE WORLD, Paulínia: Editora Animal World. Ano 3, n.15, p.28-32, 2005.
24. PALENZUELA, P. R. Los ácidos orgânicos como agentes antimicrobianos. In: XVI CURSO DE ESPECIALIZACIÓN FEDNA. (s.d.)11p. Disponível em [www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf](http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf) Acesso em 02 de setembro de 2002.
25. PENZ JÚNIOR, A. M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos. **Anais...** Santos:Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 1993. p. 111-119.
26. PONTES, A.P. **Avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) na detecção de *Salmonella* sp. em amostras ambientais de origem avícola (swab de arrasto)**. Porto Alegre. 1999. 125f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
27. RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v.82, p.632-639, 2003.
28. SAEG<sup>®</sup>. Sistema para análises estatísticas. UFV, 2001.
29. SALM-NET – CENTRO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium na Europa Ocidental, de 1993 a 1995: relatório da vigilância da Salm-Net. **Euro Surveill.** v.2, n.1, p.4-6, 1997. Disponível em [www.eurosurveillance.org/eurosurveillance/v2.n1](http://www.eurosurveillance.org/eurosurveillance/v2.n1). Acesso em 10 de janeiro de 2002.
30. SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 29, n.2, p. 87-92, 2001.

31. SESTI, L. Biosseguridade em granjas de frangos de corte: conceitos e princípios gerais. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2004 Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. 2004. p.55-72.
32. SONCINI, R. A. Controle de *Salmonella* Enteritidis na Avicultura. In: II SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2002 Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. 2002. 6p.
33. STONE, G. G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n..7, p.1742-1749, 1994.
34. STONE, G. G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; McVEY, S.; GALLAND, J. C.; CURTIS III, R.; KELLY, S. M.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR-Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p.1292-1295, 1995.
35. SCHWARZER, K. The role of organic acids and natural principles in animal health and performance. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS – AVESUI 2005 SUINOCULTURA: NUTRIÇÃO E MANEJO. **Anais...** Florianópolis: Embrapa Suínos e Aves. 2005. p.72-78.
36. Van IMMERSEEL, F.; FIEVEZ, 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.
37. Van IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in Poultry. **Poultry Science**, v.84, p. 1851-1856, 2005.
38. Van IMMERSEEL, F.; RUSSEL, J. B.; FLYTHE, M. D.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35, n.3, p. 182-188, 2006. [Resumo].

### **CAPÍTULO 3 - ÁCIDO FÓRMICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS COM *Salmonella* ENTERITIDIS E *Salmonella* TYPHIMURIUM**

**RESUMO:** Foi conduzido um experimento, utilizando-se duzentos pintos com um dia de idade. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições de dez pintos cada. A ração foi formulada a base de milho e soja, conforme as exigências nutricionais, e não utilizou-se produtos de origem animal ou conservantes. Esta ração foi contaminada experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium e tratada com ácido fórmico em cinco diferentes concentrações (0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%), no período de oito a 21 dias de idade. Simultaneamente foram analisados o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, assim como a eficiência do ácido orgânico em reduzir ou eliminar o patógeno das rações tratadas. Avaliou-se ainda a presença do agente nas excretas, suabes cloacais e *pool* de fígado, coração e vesícula biliar de uma ave de cada parcela experimental. Verificou-se que os níveis de ácido fórmico pesquisados não alteraram o desempenho das aves. Quanto à recuperação de *Salmonella* sp. das rações tratadas, observou-se que os níveis de 1,5% e 2,0% de ácido fórmico apresentaram redução da contaminação por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Observou-se isolamento da bactéria em 50% de *pool* de órgãos. No entanto, constatou-se que excretas e suabes cloacais apresentaram frequência de isolamento de 100% e 70%, respectivamente, para *Salmonella* sp.. Acido fórmico adicionado à ração nas concentrações de 1,5 e 2,0% reduz a contaminação por *Salmonella* sp. sem afetar o desempenho.

**Palavras-chave:** Ácido orgânico, contaminação bacteriana, desempenho, ração.

**FORMIC ACID FOR BROILER FED RATIONS EXPERIMENTALLY  
CONTAMINATED WITH *Salmonella* ENTERITIDIS AND *Salmonella*  
TYPHIMURIUM**

**ABSTRACT:** An experiment was carried out with 200 day-old chicks. Birds were allotted in a completely randomized design with five treatments and four replications of 10 chicks each. Ration was based on corn-soybean, formulated according to nutritional requirements and without any kind of animal by-product or conservatives. This ration was experimentally contaminated with *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium and treated acetic acid in five different concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%) from eight to 21 days of age. Weight gain, feed intake and feed-to-gain ratio and, simultaneously, to evaluate the efficiency of the acetic acid to reduce and/or eliminate the pathogen from experimental rations in the different acid levels supplemented. The presence of the bacteria was evaluated from cloacal swabs and organs pool liver, heart and gall bladder of one bird from each experimental replicate. The formic acid levels applied didn't affect performance. Formic acid concentration of 1.5% and 2.0% determined reduction in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium contamination. Bacteria was isolated from 50% the organs pool evaluated. Besides, in excreta and cloacal swabs, isolates frequency was 100 and 70%, respectively, to *Salmonella* sp.. Formic acid at 1.5 and 2.0% concentration was effective to reduce *Salmonella* sp. contamination in ration, without affecting performance.

**Key Words:** Bacterial contamination, organic acid, performance, ration.

## INTRODUÇÃO

A Rede Européia de Vigilância de Salmonella, analisando surtos de toxinfecção em humanos, reportou que entre 1993 e 1995, 75% dos isolamentos monitorados correspondiam a *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Informou ainda que neste período, a identificação de *Salmonella* Enteritidis decresceu 16,40% e *Salmonella* Typhimurium subiu consideravelmente ou 15,20% (SALM-NET, 1997). Esses autores observaram que o decréscimo do isolamento de *Salmonella* Enteritidis correspondeu às ações e iniciativas para preservar a saúde pública, dando especial ênfase à importância do controle da infecção nos aviários e à maior conscientização dos manipuladores de alimentos e da comunidade em geral. No entanto, ponderaram que a infecção por *Salmonella* Typhimurium era considerada um problema emergente, com o agravante de que a maioria das cepas isoladas na Inglaterra eram multirresistentes aos medicamentos, o que reduz as alternativas terapêuticas nos casos de infecções invasivas.

No Brasil, KAKU et al. (1995) relataram surto alimentar em uma escola, no ano de 1993, sendo *Salmonella* Enteritidis o sorovar isolado.

Mais recentemente, em 2005, a DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR do Centro de Vigilância Epidemiológica, da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, reportou a ocorrência de um surto de toxinfecção por *Salmonella* sp. num evento científico. Identificaram que a Taxa de Ataque (TA) geral do surto correspondeu a 51%. O sorovar isolado em 100% das amostras foi *Salmonella* Typhimurium.

No tocante às matérias-primas destinadas à fabricação de rações fornecidas às aves, pode-se afirmar que as mesmas são excelente meio de introdução de *Salmonella* sp. nas criações avícolas. BERCHIERI JÚNIOR et al. (1989) pesquisaram de uma granja comercial 35.000 frangos de corte e avaliaram pintos de um dia de vida e grupos de amostras constituídas por cama das aves, ração, ingredientes da ração, colhidas semanalmente até o abate. Observaram que a farinha de origem animal utilizada foi uma das principais vias de introdução da *Salmonella* sp. na granja.

ALBUQUERQUE et al. (1999), analisando 136 amostras de ingredientes de rações, 43 amostras de rações prontas (cinco destinadas à

alimentação de suínos e 38 a aves) e 110 suaves de pó, constataram que 19,85% das amostras de matérias-primas estavam contaminadas por *Salmonella* sp., sendo que 50% de origem animal. Constataram também que 4,65% das rações prontas eram positivas para o patógeno e para rações, sem ingredientes de origem animal, isolaram o agente em 2,63% das amostras.

A aplicação de aditivos de origem química em alimentos destinados a animais, ou acidificantes, tornou-se alternativa para manutenção da boa qualidade das rações do ponto de vista microbiológico e com aceno de melhoria para o desempenho zootécnico das aves (GONZALES, 2004).

O ácido fórmico ou ácido metanóico é o mais simples dos ácidos orgânicos de cadeia curta e possui fórmula molecular HCOOH. Possui pKa 3,75, o que significa dizer que nesta faixa de pH há dissociação de 50% do ácido.

BYRD et al. (2001) relataram que o ácido fórmico em concentração de 0,5% tem sido empregado eficientemente na água para aves submetidas à restrição alimentar, no período de oito horas que antecede ao abate, reduzindo a ocorrência de *Salmonella* Typhimurium no Inglúvio.

CANIBE et al. (2001) relataram que ácido fórmico puro ou em associação a outro ácido orgânico tem sido efetivo para prevenção de *Salmonella* sp.. De acordo com OSTERMANN et al. (2005), o efeito bactericida ou bacteriostático do ácido orgânico baseia-se na sua capacidade de difusão nos microrganismos através da membrana e interiorização no citoplasma. No entanto, a apresentação do ácido deve ser em sua forma não-dissociada, para que a ação bactericida seja efetiva.

Considerando a relevância da presença de *Salmonella* sp. na indústria avícola, a preocupação com a saúde pública e a interrelação dos produtos de origem aviária e sua comercialização nacional e internacional, objetivou-se com o presente estudo verificar o efeito da aplicação de ácido fórmico em rações experimentalmente contaminadas fornecidas a aves. Para tanto, avaliou-se a recuperação de *Salmonella* sp. em após a contaminação das rações com o patógeno e o desempenho do lote no período de um a vinte e um dias de idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local

O experimento foi conduzido no Isolamento do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG), de setembro a outubro de 2004.

As análises laboratoriais de isolamento e identificação bacteriana e biologia molecular foram conduzidas no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da UFG.

### Delineamento e Tratamentos

Foram alojados 200 pintos de um dia de idade, machos, de linhagem Cobb. As aves foram distribuídas em cinco tratamentos e quatro repetições de 10 pintos cada, em baterias aquecidas de aço galvanizado.

Inicialmente, os pintos foram pesados em grupos de dez para a composição das parcelas experimentais e distribuídos homoganeamente tendo como base o peso.

Os tratamentos foram caracterizados pela adição de ácido fórmico, nos níveis de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%, a uma ração contaminada por suspensão bacteriana de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, perfazendo cinco tratamentos, respectivamente.

A cada sete dias as aves das parcelas experimentais foram pesadas e a sobra de ração retirada, computada e descontada do total de ração fornecida. Calculou-se então o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar. Também foram anotados os óbitos durante o período de alojamento e descontados durante o período de alojamento.

Antes de ser fornecida a cada lote de pintos, a ração e a água foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* sp.. Os forros de caixa de transporte de pintos foram recolhidos e também submetidos à pesquisa do patógeno. Para todas as amostras, seguiu-se a metodologia descrita em BRASIL (1995).



## Alimentação das aves

A ração fornecida às aves foi formulada, a base de milho e soja, sendo preparada na fábrica da Escola de Veterinária e não havendo incorporação de ingredientes de origem animal ou aditivos. Para todos os tratamentos foi fornecido o mesmo nível de energia (3.122 kcal/kg), assim como o mesmo percentual de proteína (20,87%). Sua composição, para 100 kg, pode ser vista no Quadro 1.

**QUADRO 1.** Composição da ração fornecida às aves.

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Milho	57,078
Farelo de soja	34,538
Óleo vegetal	4,534
Fosfato bicálcico	1,770
Calcário	1,028
DL-Met 99	0,219
L-Lis HCl	0,149
Sal	0,434
Suplemento vitamínico inicial	0,250
Total (%)	100
<b>Composição nutricional calculada</b>	
	<b>Nível</b>
EM	3122 kcal
PB	20,877%
Cálcio	0,939
Fósforo total	0,672
Fósforo disponível	0,441
Potássio	0,511
Sódio	0,216
Fibra	3,261
Gordura	6,679
Ácido linoleico	3,590
Metionina	0,538
Metionina + cistina	0,879
Lisina	1,239
Treonina	0,809
Triptofano	0,277

## Culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium

Culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, estocadas em ágar nutriente, isoladas de amostras de origem aviária foram inoculadas, separadamente, em 10 mL de caldo de enriquecimento Rappaport-

Vassiliadis (RV) e caldo selenito-cistina (SC) e incubadas por 24 horas a 42°C, para multiplicação do agente. Após este período, 0,03 µL foi transferido com auxílio de alça de níquel-cromo, por semeadura em estrias e esgotamento, para ágar Hektoen e ágar Rambach e incubados por 24 horas a 37°C. As unidades formadoras de colônias (UFC), tanto de *Salmonella* Enteritidis quanto de *Salmonella* Typhimurium, foram ressuspensas, separadamente, em 1,0 mL de solução salina a 0,85%, pH 7,0. A suspensão concentrada de bactérias, em volume de 1,0 mL, baseou-se na escala de McFarland, em concentração de 10<sup>2</sup> UFC/mL, para cada sorovar.

Após 24 horas de contaminação experimental das rações, uma porção de 100 gramas de ração de cada parcela experimental foi recolhida em sacos plásticos individuais esterilizados, devidamente identificados, e encaminhados para pesquisa de *Salmonella* sp., conforme BRASIL (1995). As amostras negativas no isolamento bacteriológico foram analisadas pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), conforme BEJ et al. (1994).

### **Contaminação e tratamento das rações**

As rações contaminadas foram oferecidas às aves a partir do sétimo dia de alojamento, devido a adaptação na primeira semana de vida, com finalidade de permitir a observação de quaisquer anormalidades que pudessem comprometer o desenvolvimento normal do lote e/ou mascarar a contaminação experimental e/ou o tratamento químico.

Após pesagem das aves, de cada parcela experimental, 200 gramas de ração foram recolhidas, acondicionadas em sacos plásticos e contaminadas com 1,0 mL de suspensão de *Salmonella* Enteritidis e 1,0 mL de suspensão de *Salmonella* Typhimurium. A homogeneização ocorreu até a completa absorção do líquido pela ração. Em período posterior a uma hora, estas alíquotas foram incorporadas às respectivas rações, ocorrendo nova homogeneização.

Após 24 horas de contaminação, cada balde teve uma amostra de 100 gramas de ração retirada para pesquisa de *Salmonella* sp.. Neste momento, as rações foram acidificadas conforme cada tratamento e homogeneizadas.

Decorridas 24 horas de acidificação, o pH foi determinado por meio de homogeneização manual vigorosa por 30 minutos em 50 mL de água destilada. Após repouso por cinco minutos e procedeu-se a leitura em pHmetro digital.

### **Pesquisa de *Salmonella* sp. nas diferentes categorias de amostras**

A pesquisa de *Salmonella* obedeceu o preconizado por BRASIL (1995) e GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com modificações. Dentre as categorias de amostras citam-se:

- forro de caixa de transporte de pintos, duas amostras ;
- ração recém preparada, uma amostra;
- ração não contaminada fornecida às aves durante a primeira semana, 20 amostras;
- ração contaminada fornecida às aves logo após o sétimo dia de vida, 20 amostras;
- *pool* de coração, fígado e vesícula biliar de uma ave, 20 amostras;
- excreta final aos 21 dias de vida, 20 amostras;
- suabe cloacal de uma ave, 20 amostras.

Finalizado o experimento, aos 21 dias de alojamento, uma ave de cada grupo foi sacrificada, identificada e analisada com vistas à presença de lesões anatomopatológicas e pesquisa de *Salmonella* sp. nos órgãos de eleição ou *pool* de coração e fígado associado à vesícula biliar.

### **Isolamento e identificação de *Salmonella* sp. pela técnica bacteriológica convencional**

Os forros de caixa foram identificados, cortados com tesouras esterilizadas, raspados com colheres esterilizadas e as amostras aliquoteadas em sacos plásticos esterilizados. Foram distribuídos dois gramas da amostra em 20 mL de água peptonada tamponada (APT) a 1%, a 37°C por 24 horas. Em seguida, procedeu-se o enriquecimento seletivo inoculando 1,0 e 0,1 mL, respectivamente, em 10 mL de caldos selenito-cistina (SC) e Rappaport-Vassiliadis (RV), incubando a 42°C por igual período de tempo.

Em relação às rações, após homogeneização da amostra de 100 gramas, transferiu-se 25 gramas para caldo de pré-enriquecimento constituído de 225 mL de água peptonada tamponada (APT) a 1% e incubou-se a 37°C, por 24 horas. Após este período, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram transferidas para 10 mL de SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

Amostras compostas por órgãos foram trituradas, homogeneizadas e fracionadas em unidades de 1,0 e 0,1 grama. A seguir, foram transferidas para 10 mL dos caldos SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

Os suabes cloacais foram transportados embebidos em água peptonada tamponada a 0,1% e submetidos ao pré-enriquecimento em 10 mL de APT a 1,0%, a 37°C por 24 horas. Ato contínuo, 1,0 e 0,1 mL de APT a 1,0% foram transferidos para 10 mL de SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

As excretas foram homogeneizadas e transferidas unidades analíticas de 1,0 e 0,1 grama para 10 mL dos caldos SC e RV, respectivamente. A incubação procedeu-se a 42°C, por 24 horas.

Finalizado o período de incubação dos caldos, uma alíquota de 0,03 µL de cada caldo foi transferida com auxílio de alça de níquel-cromo calibrada, para placas de Petri contendo ágar MacConkey (MC) e ágar Hektoen (HK). Procedeu-se à semeadura em superfície por esgotamento em estrias. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Finalizado este período, de cinco a oito unidades formadoras de colônias (UFC) sugestivas de pertencerem ao gênero *Salmonella* foram repicadas em ágar triplice açúcar ferro (TAF) e incubadas a 37°C, por 18 horas. Quando o número de UFC era inferior a cinco, todas as colônias foram pescadas e submetidas ao mesmo procedimento.

As culturas em ágar triplice açúcar ferro (TAF) com reações compatíveis para o gênero *Salmonella* sp. foram identificadas bioquimicamente. As provas bioquímicas foram incubadas a a 37°C por até sete dias, com leituras diárias.

Das culturas bioquimicamente confirmadas como *Salmonella* sp. foi realizada a prova sorológica com soros polivalentes anti-O e anti-H, realizados a partir de culturas jovens de 18 horas de incubação em ágar nutriente e ressuspendidas em solução salina 0,85%. Após a confirmação sorológica, foram estocadas em ágar nutriente e enviadas ao Departamento de Bacteriologia do

Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ) para tipagem sorológica.

### Recuperação bacteriana das rações tratadas quimicamente

As rações tratadas com as diferentes concentrações do ácido acético foram recolhidas 24 horas após a acidificação. De cada parcela, foram retirados 100 gramas e acondicionados em sacos plásticos esterilizados, identificados individualmente, e posteriormente lacrados. Foram homogeneizados 10 gramas em 90 mL de APT a 1,0%. A partir desta diluição e empregando solução salina 0,85%, foram preparadas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . De cada diluição, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada em superfície em placas de ágar Rambach e incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura das placas baseou-se na diferenciação entre as UFC's de *Salmonella* e outros gêneros conforme GRUENEWALD et al. (1991) e ALBUQUERQUE et al. (1998).

Nas diferentes concentrações do ácido e das quatro repetições foram obtidas quatro diluições seriadas para enumerar o patógeno cujos resultados foram transformados em escores, conforme contagem em placa de Petri de 65 cm<sup>2</sup> (Tabela 1).

**TABELA 1.** Escore de crescimento de *Salmonella* sp. em rações avícolas experimentalmente contaminadas e tratadas quimicamente com ácido acético.

Escore	Observações efetuadas
0	Ausência de crescimento
1	1 a 100 UFC/placa
2	10 a 25 UFC/ cm <sup>2</sup> de placa
3	25 a 100 UFC/ cm <sup>2</sup> de placa
4	Número incontável de UFC, com alteração da coloração do meio

Adaptado de ALBUQUERQUE et al. (1998).

### **Detecção de *Salmonella* sp. pela técnica de PCR**

As amostras negativas para *Salmonella* sp. analisadas pela técnica bacteriológica convencional foram submetidas à detecção do gênero pela técnica de PCR. Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL das culturas nos caldos SC e RV, de todas as amostras cultivadas e acondicionadas em tubos de polipropileno e estocadas a -18°C, para uso posterior.

O DNA genômico foi extraído apenas do caldo SC, uma vez que este apresentou maior eficiência no isolamento bacteriano.

Após descongelamento, os tubos foram centrifugados a 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 567 µL de tampão Tris-EDTA (TE), pH 8,0. A lise foi realizada com 30 µL de dodecyl sulfato de sódio (SDS) a 10%, seguindo-se homogeneização vigorosa e incubação a 37°C por uma hora em banho-Maria. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de NaCl a 5M. Após homogeneização vigorosa foram adicionados 80 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) a 10%, pré-aquecido a 65°C. Homogeneizou-se vigorosamente e incubou-se a 65°C por 10 minutos. À solução anterior, adicionou-se 700 µL em igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C (AUSUBELL et al., 1993).

O sobrenadante foi transferido para novo tubo, igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado e a centrifugação realizada conforme já descrito. Este procedimento foi repetido até o desaparecimento completo da interface esbranquiçada. Uma vez finalizada a purificação a precipitação do DNA foi realizada com o uso de etanol PA gelado, na proporção de 2 a 3 vezes o volume do sobrenadante e incubação a -18°C por 24 horas.

Finalizado este período, seguiu-se centrifugação a 10.000 rpm a durante 10 minutos. O álcool foi descartado vertendo-se o tubo cuidadosamente para que não houvesse descarte do DNA. Os tubos foram novamente acrescidos de etanol PA, submetidos a -18°C por 20 horas.

Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente e nova precipitação realizada conforme descrito. Uma vez centrifugadas, as amostras foram tratadas com álcool 70% gelado. O álcool foi

descartado e o *pellet* seco ao ar. O DNA foi ressuspendido ou hidratado com tampão TE, pH 8,0.

A determinação da concentração de DNA do material extraído foi realizada por eletroforese, em gel de agarose.

Para a amplificação, 5,0 µL da amostra extraída foi incorporada aos reagentes da reação. Para tanto, foram utilizadas as concentrações de 50 mM TrisCl (pH 8,9), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP's, 0,5 µM dos *primers* SHIMA – L e SHIMA – R (BEJ et al, 1994); água milli-Q; 2,5 U de Taq polimerase. O *primer* SHIMA-L tem a descrição (5'-CGT-GCTCTGGAAAACGGTGAG-3') e o SHIMA-R 5'-CGTGCTGTAATAGGAATATCTTCA-3'.

O produto desta mistura para amplificação foi submetido a 35 ciclos de amplificação com desnaturação por 3 minutos a 94°C; 35 ciclos compostos por três etapas de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C e 30 segundos a 72°C. Uma etapa final de todo o ciclo de amplificação de 3 minutos a 72°C, sendo a extensão final conforme preconizado por BEJ et al. (1994). A amplicon desta reação apresenta 122 pares de base.

Foram utilizados controles positivos formados por culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Os controles negativos utilizados foram o complexo da reação sem *primer*. Dos produtos do PCR ou amplicons foi retirada uma alíquota de 10 µL para a eletroforese em gel de agarose a 1,0% em TBE durante 40 minutos a 9 V/cm. Após coloração do gel com brometo de etídeo, procedeu-se a observação em transiluminador de luz ultravioleta (BEJ et al., 1994).

### **Avaliação de desempenho**

Todas as aves e rações das parcelas experimentais foram pesadas no primeiro, sétimo, 14<sup>º</sup> e 21<sup>º</sup> dias de vida. Em caso de morte, o peso da ave foi registrado para posterior correção do peso final da parcela, bem como do consumo de ração e da conversão alimentar.

O peso final foi obtido pelas médias das parcelas. O consumo de ração calculado pela diferença entre a quantidade de ração fornecida, sobras e amostras retiradas e a conversão alimentar pela relação entre o consumo e o

ganho de peso. Para a avaliação das variáveis, considerou-se o período de 8 a 21 dias, ocasião em que houve a contaminação experimental das rações e sua acidificação.

### **Análises estatísticas**

Os dados referentes ao desempenho foram submetidos à análise de regressão polinomial pelo programa SAEG (2001), versão 9.0. A análise dos dados de isolamento e recuperação de *Salmonella* sp. baseou-se na frequência de observação do patógeno e na estimativa de escores, respectivamente.



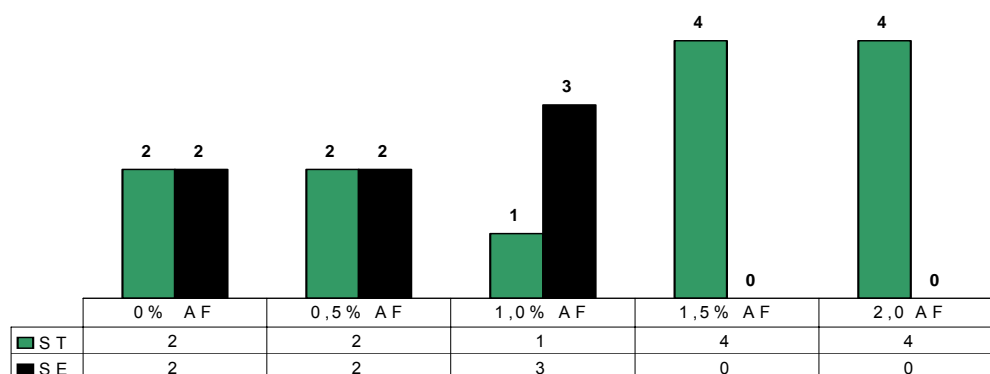
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes à detecção de *Salmonella* sp. em diferentes fontes, pelas técnicas de isolamento bacteriano convencional (IBC) e reação em cadeia pela polimerase (PCR), em fase anterior ao alojamento dos pintos. Somente foram analisadas pelo PCR amostras negativas ao ICB.

**TABELA 2.** *Salmonella* sp. em diferentes fontes avaliadas anteriormente ao alojamento das aves.

Fonte	Isolamento bacteriano convencional	PCR
forro de caixa de transporte de pintos	0/1	0/1
ração recém preparada	0/1	0/1
ração não contaminada	0/20	0/20
Positivas/total	0/22	0/22
(%) negativas	100	100

A contaminação experimental das rações revelou-se eficiente, uma vez que todas as amostras analisadas pela técnica microbiológica convencional apresentaram resultado positivo para *Salmonella* sp.. No entanto, observou-se que ocorreu isolamento de *Salmonella* Enteritidis (SE) em sete parcelas experimentais e *Salmonella* Typhimurium (ST) em treze parcelas de rações contaminadas experimentalmente e não tratadas, como pode ser visto na Figura 1.



**FIGURA 1.** *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST) em ração contaminada experimentalmente nas vinte parcelas experimentais sem adição de ácido fórmico (AF).

Em todas as parcelas experimentais deveria ter ocorrido a presença de SE e ST. No entanto, não se observou ocorrência concomitante dos dois sorovares. É possível que haja competição entre os dois sorovares e que SE apresente menor capacidade de adaptação ao meio de composição da ração, bem como menor capacidade de competir frente ao sorovar ST; explicação esta que pode ser ampliada no que tange à menor possibilidade de adaptação do sorovar ao ambiente com baixa atividade de água e maior percentual de óleos.

Observando a Tabela 3, nota-se que *Salmonella* sp. foi detectada em excretas submetidas à análise bacteriológica convencional em 50, 50, 75, 100 e 0%, respectivamente, aos níveis de ácido fórmico de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%. Porém, ao empregar a técnica de PCR para amostras negativas ao isolamento bacteriano convencional, observou-se positividade de 100, 100%, 100 e 100% para os níveis de 0, 0,5, 1,0 e 2,0% respectivamente; sendo que do nível de 1,5% de ácido não houve análise realizada.

**TABELA 3.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) de excretas de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Excretas					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e PCR)
0% de AF	2/4	50	ST*	2/2	100	100
0,5% de AF	2/4	50	ST	2/2	100	100
1,0% de AF	3/4	75	ST	1/1	100	100
1,5% de AF	4/4	100	ST	NR	NR	100
2,0% de AF	0/4	0	-	4/4	100	100
<b>Total</b>	<b>11/20</b>	<b>55</b>		<b>9/9</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\* - *Salmonella* Typhimurium

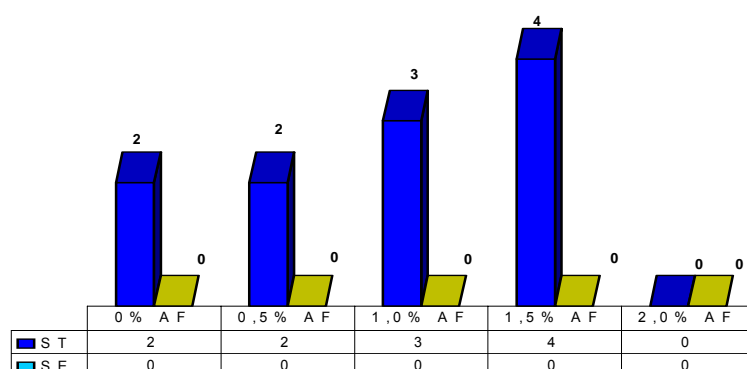
Tendo em vista os resultados apresentados acima, observa-se que as amostras submetidas à análise bacteriológica revelaram um percentual de positividade de 55%. Porém, com o intuito de complementar tais análises, realizou-se o PCR e detectou-se 100% de positividade para as 9 amostras analisadas.

Estes resultados são semelhantes às descrições feitas por FLUIT (1995) quando citou que os caldos de enriquecimento seletivos empregados em amostras altamente contaminadas favorecem a identificação do patógeno pela

reação da cadeia pela polimerase, amenizando a ação de interferentes nos procedimentos. Também OLIVEIRA et al. (2004) destacaram melhores resultados para o PCR quando comparado ao IBC.

Estes resultados também se assemelham aos de STONE et al. (1994) e STONE et al. (1995) quando relataram que amostras fecais enriquecidas com caldo selenito-cistina apresentam resultados positivos significativos na detecção de *Salmonella* spp. pelo PCR, principalmente para o sorovar *Salmonella* Typhimurium.

Analisando o isolamento dos sorovares ST e SE nas excretas das aves alimentadas com ração contaminada experimentalmente e tratada com ácido fórmico, observa-se que SE não foi identificada em nenhum tratamento. Nas 20 amostras analisadas, nota-se o isolamento de 55% para ST, como pode ser visto na Figura 2. Este dado é relevante e confirma a resistência do sorovar às variações de pH, mesmo elevado, em valores que não são considerados ideais para sua sobrevivência e crescimento (KWON et al., 2000; RICKE, 2003).



**FIGURA 2.** Detecção de *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Enteritidis (SE), pelo IBC, em excretas de aves, com 21 dias de idade, alimentadas com ração contaminada experimentalmente e tratadas com níveis crescentes de ácido fórmico.

Ainda, a respeito da tolerância da *Salmonella* Typhimurium aos ácidos orgânicos, KWON & RICKE (1998) comprovaram a evidência de que este sorovar demonstra habilidade frente aos ácidos, tanto no trato gastrointestinal das aves como em rações tratadas pelos mesmos.

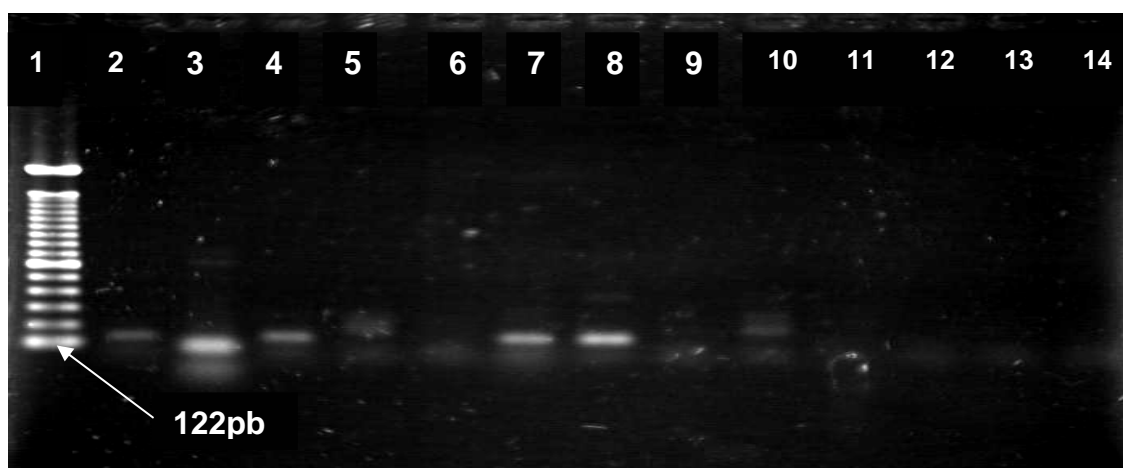
Há evidência de que os ácidos orgânicos contribuem para o aumento da virulência do patógeno devido a presença de genes que codificam as proteínas *RpoS* e *Fur*, presentes no citoplasma da bactéria. Estas proteínas são ativadas em pH baixo induzido somente por ácidos orgânicos. A *RpoS* determina alteração

bacteriana, na fase estacionária de seu crescimento e, em consequência, tolerância à diminuição do pH. A proteína *Fur* está relacionada à regulação do metabolismo do ferro e envolvida na fase log de crescimento bacteriano, pois promove rápida adaptação ao baixo pH do meio (RYCHLIK & BARROW, 2005).

Quanto à detecção de *Salmonella* sp. pela técnica de PCR, pode-se afirmar que os resultados positivos ao PCR estão relacionados à salmonelas que não foram capazes de suplantar o estado de injúria ou que encontravam-se em pequeno número de células para a detecção por ICB.

A Figura 3 representa o resultado padrão obtido pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Observa-se que ocorreram algumas reações inespecíficas explicadas pelas descrições de PERSING (1991) e SCHRANK et al. (2001) quando consideram amostras muito contaminadas como favoráveis à este tipo de reação. Este fato, também pode ser explicado parcialmente tendo como base os achados de CHEN et al. (2000). No entanto, não invalidam os resultados encontrados neste ensaio.

É possível observar a presença de resultados positivos. Estes achados ressaltam as descrições realizadas por BEJ et al. (1994). Tais autores identificaram resultados satisfatórios para reações positivas quando da aplicação do *primer* SHIMA, adotado neste experimento, para diversos sorovares de *Salmonella* sp..



**FIGURA 3.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Na canaleta 1 está o padrão de peso molecular (DNA *ladder* 100pb). Na canaleta 2 está o controle positivo de *Salmonella* (*Salmonella* Typhimurium isolada de carcaça de frango). Na canaleta 3 está outro controle positivo (*Salmonella* Enteritidis isolada de carcaça de frango). Nas canaletas 5 e 14 encontram-se os controles negativos, nas canaletas (4, 6, 7, 8 e 9) encontram-se amostras positivas e nas demais canaletas (10, 11, 12 e 13) encontram-se amostras negativas.

Quanto aos resultados referentes a *pools* de órgãos, analisando a Tabela 4, pode-se observar 0% de detecção do agente ao ICB e 50% ao PCR, denotando maior eficiência desta técnica.

**TABELA 4.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) para *pool* de coração, fígado e vesícula biliar de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Pool de órgãos					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e/ou PCR)
0% de AF	0/4	0	-	4/4	100	100
0,5% de AF	0/4	0	-	1/4	25	25
1,0% de AF	0/4	0	-	1/4	25	25
1,5% de AF	0/4	0	-	3/4	75	75
2,0% de AF	0/4	0	-	1/4	25	25
<b>Total</b>	<b>0/20</b>	<b>0</b>		<b>10/20</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

Ressalta-se que coração, fígado e vesícula biliar não apresentaram sinais macroscópicos sugestivos de salmonelose aviária ao exame de necropsia. Neste sentido, os resultados obtidos pela reação em cadeia pela polimerase podem ser justificados na alta sensibilidade da técnica a baixo número de UFC's e na baixa concentração de DNA (STONE et al., 1995; PONTES, 1999; SANTOS et al. 2001).

Os resultados referentes aos suabes cloacais (Tabela 5) atestam a contaminação cecal. Nota-se que ao IBC, 50% das amostras analisadas foram positivas para o agente. Quanto aos resultados para o PCR, observa-se que das 10 amostras submetidas à técnica, somente 40% mostraram-se positivas. Porém, quando os resultados das duas técnicas são somados, verifica-se que 70% de todas as amostras denotaram o agente detectado.

Em virtude deste percentual, pode-se aferir que ocorreu excreção de *Salmonella* sp. Como as amostras foram colhidas aos 21 dias de vida das aves e sabendo-se que as rações tinham sido tratadas com diferentes níveis de ácido fórmico é possível que este ácido não tenha promovido a eliminação do agente dos cecos.

**TABELA 5.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) para suabes cloacais de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Suabes cloacais					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e/ou PCR)
0% de AF	3/4	75	ST*	1/1	100	100
0,5% de AF	1/4	25	ST	2/3	66,67	50
1,0% de AF	1/4	25	ST	0/3	0	25
1,5% de AF	3/4	75	ST	0/1	0	75
2,0% de AF	2/4	50	ST	1/2	50	75
<b>Total</b>	<b>10/20</b>	<b>50</b>		<b>4/10</b>	<b>40</b>	<b>70</b>

\* - *Salmonella* Typhimurium

O grau de dissociação do ácido fórmico em pH 6,0 é de 99% (LE NY, 2005). A Tabela 6 apresenta os valores de pH das rações tratadas e não tratadas, conforme a concentração de ácido fórmico. Estes dados permitem afirmar que um percentual menor que 1% da forma não-dissociada estava presente o que não confere ao ácido a eficiência satisfatória na redução ou eliminação bacteriana, conforme as ponderações de PALENZUELA (s,d); LE NY (2005). Também, é importante salientar que nestas faixas de pH o crescimento de *Salmonella* sp. é evidente.

**TABELA 6.** Valores de pH das rações no período de 24 horas após a adição de ácido fórmico (AF) em suas diferentes concentrações.

Bateria 1	pH	Bateria 2	pH	Bateria 3	pH	Bateria 4	pH	Médias de pH
0% AF	7,1	0% AF	7,1	0% AF	7,3	0% AF	7,1	<b>7,15</b>
0,5% AF	6,8	0,5% AF	6,7	0,5% AF	6,8	0,5% AF	6,7	<b>6,75</b>
1,0% AF	6,6	1,0% AF	6,7	1,0% AF	6,6	1,0% AF	6,6	<b>6,63</b>
1,5% AF	6,4	1,5% AF	6,4	1,5% AF	6,3	1,5% AF	6,6	<b>6,43</b>
2,0% AF	6,3	2,0% AF	6,3	2,0% AF	6,2	2,0% AF	6,5	<b>6,33</b>

LE NY (2005) relatou que em pH 5,0 a concentração inibitória mínima de ácido fórmico para *Salmonella* sp. requer um valor aproximado de 0,10%; neste pH e nesta concentração o ácido fórmico apresenta 5% de sua forma não-dissociada.

No tocante a recuperação e determinação de escore de crescimento de *Salmonella* sp., a seleção baseou-se na morfologia e coloração das UFC's crescidas em ágar Rambach, conforme as descrições de GRUENEWALD et al. (1991) e a contagem de unidades formadoras de colônias de *Salmonella* sp., descrita sob a forma de escore conforme ALBUQUERQUE et al. (1998). Estes dados podem ser visualizados na Tabela 7.

Analisando conjuntamente os resultados das Tabelas 6 e 7, à luz da ação do ácido fórmico na forma não-dissociada, frente a um determinado valor de pH, nota-se a redução evidente da recuperação de *Salmonella* sp. nas concentrações 1,5 e 2,0% de ácido fórmico, apesar do pH superior a 6,0 nas duas concentrações.

**TABELA 7.** Escore de *Salmonella* sp. nas quatro diluições de amostras de ração contaminada e tratada com níveis crescentes de ácido fórmico (AF).

Tratamento		Escore de <i>Salmonella</i> sp. para as quatro repetições			
		Diluições das quatro repetições de cada tratamento			
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
0% de AF	R1	4	4	2	0
	R2	4	4	3	1
	R3	4	3	2	1
	R4	4	3	1	0
0,5% de AF	R1	3	2	0	0
	R2	4	1	1	0
	R3	4	2	1	1
	R4	4	2	1	0
1,0% de AF	R1	3	1	1	0
	R2	2	1	0	0
	R3	2	1	0	0
	R4	2	0	0	0
1,5% de AF	R1	1	1	0	0
	R2	1	1	1	0
	R3	1	1	1	0
	R4	1	1	1	0
2,0% de AF	R1	1	1	0	0
	R2	1	1	0	0
	R3	1	0	0	0
	R4	1	0	0	0

R - repetição dos tratamentos

10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> correspondem às diluições seriadas

Legenda do escore de crescimento bacteriano:

0 = ausência de crescimento; 1 = 1 a 100 UFC por placa; 2 = 10 a 25 UFC por centímetro quadrado da placa; 3 = 25 a 100 UFC por centímetro quadrado da placa e 4 = número incontável de UFC, com alteração da coloração do meio.

Portanto, são pertinentes as afirmações de DIBNER & BUTTIN (2002) em relação à eficácia bactericida de ácidos orgânicos, no tocante a dependência

da interação de vários fatores. Para estes autores, há íntima relação entre o local de ação, o pH do ambiente de incorporação do ácido, a heterogeneidade bacteriana do ambiente avaliado, a capacidade tamponante das matérias-primas da ração e a concentração inibitória mínima do aditivo. Assim, não se pode avaliar a ação do ácido somente pela sua forma estrutural em determinado valor de pH.

No que se refere à ação bactericida do ácido fórmico nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% (Tabelas 6 e 7), observa-se que o mesmo não mostra eficiência na eliminação de salmonelas em todos os tratamentos. Estes resultados contrastam-se parcialmente com os achados de SILVA et al. (2005) que avaliaram concentrações 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0% de ácido fórmico em relação ao efeito bactericida para *Salmonella* sp. em rações. Esses autores verificaram que em 24 horas após a incorporação do ácido, a concentração de 0,5% não eliminou a bactéria em nenhuma das observações. Nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0% obtiveram 80% de isolamento para salmonelas, na de 2,5%, 70% e na de 3,0% o patógeno não foi isolado. Porém, aos sete dias após a incorporação do ácido, na concentração de 3%, observaram a presença do agente em 20% dos ensaios. Deste modo, é oportuno considerar que a incorporação de ácido deve ser constante, pois aumento na frequência de isolamento de *Salmonella* sp. ocorre com o passar do tempo reforçando as descrições de PENZ JÚNIOR et al. (1993).

Ainda, analisando os dados contidos na Tabela 7, verifica-se que, nas quatro repetições, o ácido fórmico pode ser considerado eficiente na redução de *Salmonella* sp. nas concentrações de 1,5 e 2,0% na ração, uma vez que a frequência de recuperação de *Salmonella* sp. apresenta-se menor quando comparada aos demais tratamentos.

Durante toda fase experimental ocorreu óbito de uma ave do tratamento 2 ou aves alimentadas com ração contaminada e tratada com 0,5% de ácido fórmico.

Os dados referentes ao desempenho das aves podem ser vistos na Tabela 8. Nota-se que não houve diferença significativa para as variáveis avaliadas, em nenhum dos níveis de ácido preconizados, no período de 8 a 21 dias de idade.



**TABELA 8.** Peso inicial (PI), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), peso final (PF) e conversão alimentar (CA) de frangos alimentados com rações contaminadas experimentalmente por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium contendo níveis crescentes de ácido fórmico (AF), período de 8 a 21 dias de idade.

<b>Nível de AF</b>	<b>PI</b>	<b>CR</b>	<b>GP</b>	<b>PF</b>	<b>CA</b>
<b>0</b>	185	1181	732	917	1,62
<b>0,5%</b>	188	1184	729	917	1,63
<b>1,0%</b>	186	1181	730	917	1,62
<b>1,5%</b>	188	1179	728	917	1,62
<b>2,0%</b>	186	1181	730	915	1,62
<b>Efeito*</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	-	-	-	-	-
<b>Probabilidade</b>	<b>&gt;0,5</b>	<b>&gt;0,5</b>	<b>&gt;0,5</b>	<b>&gt;0,5</b>	<b>&gt;0,5</b>
<b>CV (%)</b>	<b>2,05</b>	<b>0,64</b>	<b>0,54</b>	<b>0,21</b>	<b>0,61</b>

\* - ns – não significativo

Isto permite considerar que ácido fórmico nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% em rações não alterou o consumo de ração, bem como ganho de peso, final e conversão alimentar. Nestas condições experimentais a aplicação deste ácido orgânico, nas concentrações avaliadas não conferiu melhoria aos índices de desempenho; outrossim, não determinou piores valores quando comparados entre si e com o grupo de frangos alimentados com ração contaminada não acidificada.

## CONCLUSÕES

1. Concentrações de ácido fórmico de 0,5, e 1,0% não foram eficientes em reduzir ou eliminar *Salmonella* sp. de rações.
2. Ácido fórmico nas concentrações de 1,5, e 2,0% reduziu a contaminação de *Salmonella* sp. em rações de aves.
3. Ácido fórmico a 1,5, e 2,0% reduziu a contaminação por *Salmonella* sp. em rações, mas não melhorou o desempenho das aves em fase inicial de vida.
4. Nas condições experimentais deste estudo, ácido fórmico nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% não alterou o desempenho das aves.

## REFERÊNCIAS

1. ALBUQUERQUE, R., ITO, N. M. K., MIYAJI, C. I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bactericida e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella* spp. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 35, n.6, p.279-282, 1998.
2. ALBUQUERQUE, R., ITO, N.M.K., MIYAJI, C.I. Estudo da ocorrência de salmonelas em ingredientes, rações e suaves de pó colhidos em uma fábrica industrial de ração. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.6, p.54-61, 1999.
3. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SMITH, J.A., SIDEMAN, J.G., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley e Sons, Inc, New York: p.18-21, 1987.
4. BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H.; BOYCE, M. J.; ATLAS, R. M. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p.-368-373, 1994.
5. BERCHIERI JÚNIOR, A., ADACHI, S.Y., CALZADA, C.T., PAULILLO, A.C., SCHOKEN-ITURRINO, R.P., TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.9, n.12, p.9-12, 1989.
6. BRASIL. Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*)**. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Brasília, n.212, p.17694-17698, de 06 de novembro. Seção I, 1995.
7. 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.
8. CANIBE, N.; ENGBERG, R. M.; JENSEN, B. B. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. 2001. [On line]. [www.afac.slu.se/workshop%20norge/proceedings%20Oslo.htm](http://www.afac.slu.se/workshop%20norge/proceedings%20Oslo.htm) - Acesso em 23 de Janeiro de 2006.
9. CANSIAN, R. L.; FLORIANI, S. T. R.; VALDUGA, E. Microbiological analysis of critical points in the chicken industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.3, p.403-406, 2005.

10. CHEN, W.; MARTINEZ, G.; MULCHANDANI, A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. **Analytical Biochemistry**, v. 280, p.166-172, 2000.
11. 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.
12. DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004 – Centro de Vigilância Epidemiológica – Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.3, p.515-518, 2005.
13. FERREIRA, A. P.; FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2006 Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p.56-69, 2006.
14. FLUIT, C. Detection of *Salmonella* species in fecal samples by immunomagnetic separation and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.4, p.1046-1047, 1995.
15. GEORGIA POULTRY LABORATORY. Monitoring and detection of *Salmonella* in the poultry and poultry environments, **Oakwood, 1997. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p. [Workshop]**.
16. GONZALES, E. **Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares**. In: CURSO DE FIOLOGIA DA DIGESTÃO E METABOLISMO DOS NUTRIENTES EM AVES. 2004. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP DE JABOTICABAL. Jaboticabal, SP. 56p. 2004.
17. GREENACRE, E. J.; BROCKLEHURST, T. F.; WASPE, C.R.; WILSON, D.R.; WILSON, P. D. G. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20°C: optimization and modeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.7, p.3945-3951, 2003.
18. GRUENEWALD, R.; HENDERSON, R. W.; YAPPOW, S. Use of rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.10, p.2354-2356, 1991.
19. KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; GARCIA, G. M. P.; GELLI, D. S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p.127-131, 1995.
20. KWON, Y. M.; RICKE, S. C. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p. 3458-3463, sept. 1998.

21. KWON, Y. M.; PARK, S. Y.; BIRKHOLO, S. G.; RICKE, S. C. Induction of resistance of *Salmonella* Typhimurium to environmental stresses by exposure to short-chain fatty acids. **Journal of Food Science**. v.65, n.6, p.1037-1040, 2000.
22. 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. 2005, p.158-165.
23. McMULLIN, P. Produção avícola sem antibióticos: riscos potenciais de contaminação cruzada e de detecção de resíduos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 2004. **Anais volume 2...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.211-226.
24. OLIVEIRA, S. D.; BRANDELLI, A.; CANAL, C.W. Detecção de *Salmonella* sp. e caracterização de isolados de *Salmonella* Enteritidis pela presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e rep-PCR Fingerprinting. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.2, p.157-158, 2004.
25. OSTERMANN, D.; SANFELICE, A. M.; VIEIRA, S. L.; VIOLA, E. S. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. In: AVE WORLD, Paulínia: Editora Animal World. Ano 3, n.15, p.28-32, 2005.
26. PALENZUELA, P. R. Los ácidos orgânicos como agentes antimicrobianos. In: XVI CURSO DE ESPECIALIZACIÓN FEDNA. (s.d.)11p. Disponível em [www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf](http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf) . Acesso em 02 de setembro de 2002.
27. PENZ JÚNIOR, A. M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos. **Anais...** Santos-SP, 1993, p. 111-119.
28. PERSING, D. H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1281-1285, 1991.
29. PONTES, A.P. **Avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) na detecção de *Salmonella* sp. em amostras ambientais de origem avícola (swab de arrasto)**. Porto Alegre. 1999. 125f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
30. RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v.82, p.632-639, 2003.
31. RYCHLIK, I.; BARROW, P. A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonization and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.1021-1040, 2005.

32. SAEG<sup>®</sup>. Sistema para análises estatísticas. UFV, 2001.
33. SALM-NET – CENTRO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium na Europa Ocidental, de 1993 a 1995: relatório da vigilância da Salm-Net. **Euro Surveill.** v.2, n.1, p.4-6, 1997. Disponível em [www.eurosurveillance.org/eurosurveillance/v2.n1](http://www.eurosurveillance.org/eurosurveillance/v2.n1). Acessado em 10 de janeiro de 2002.
34. SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 29, n.2, p. 87-92, 2001.
35. SCHRANK, I. S., MORES, M. A. Z., COSTA, J. L., A., FRAZZON, A. P. G., SONCINI, R., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H., SILVA, S.C. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v.82, p.45-53, 2001.
36. SILVA, L. C. C., ROMANI, F., LOURENÇO, M. C., FERREIRA, A. C. K., DALLAGNOL, H., SANTIN, E. Avaliação de um ácido orgânico como agente inibidor do crescimento de *Salmonella sp* em ração de aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola, Suplemento 7**, p.219, 2005.
37. STONE, G. G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n..7, p.1742-1749, 1994.
38. STONE, G. G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; McVEY, S.; GALLAND, J. C.; CURTIS III, R.; KELLY, S. M.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR-Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p.1292-1295, 1995.

#### **CAPÍTULO 4 – ÁCIDO PROPIÔNICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS COM *Salmonella* ENTERITIDIS E *Salmonella* TYPHIMURIUM**

**RESUMO:** Foi conduzido um experimento, utilizando-se duzentos pintos com um dia de idade. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições de dez pintos cada. A ração foi formulada a base de milho e soja, conforme as exigências nutricionais, e não utilizou-se produtos de origem animal ou conservantes. Esta ração foi contaminada experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium e tratada com ácido propiônico em cinco diferentes concentrações (0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%), no período de oito a 21 dias de idade. Simultaneamente foram analisados o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, assim como a eficiência do ácido orgânico em reduzir ou eliminar o patógeno das rações tratadas. Avaliou-se ainda a presença do agente nas excretas, suabes cloacais e *pool* de fígado, coração e vesícula biliar de uma ave de cada parcela experimental. Verificou-se que os níveis de ácido propiônico avaliados alteraram negativamente o consumo de ração e apresentou efeito quadrático para a conversão alimentar das aves. No entanto, tendo em vista a recuperação de *Salmonella* sp. das rações tratadas, observou-se que o nível de 0,5% do ácido reduziu a contaminação e os níveis de 1,0%, 1,5% e 2,0% de ácido propiônico foram eficientes quanto à eliminação do patógeno. Observou-se frequência relativa de isolamento em *pool* de órgãos, excretas e suabes cloacais de 10%, 80% e 100%, respectivamente, para *Salmonella* sp.. Ácido propiônico foi efetivo em reduzir e eliminar *Salmonella* sp. de rações.

**Palavras-chave:** Ácido orgânico, contaminação bacteriana, desempenho, ração.

**PROPIONIC ACID FOR BROILER FED RATIONS EXPERIMENTALLY  
CONTAMINATED WITH *Salmonella* ENTERITIDIS AND *Salmonella*  
TYPHIMURIUM**

**ABSTRACT:** An experiment was carried out with 200 day-old chicks. Birds were allotted in a completely randomized design with five treatments and four replications of 10 chicks each. Ration was based on corn-soybean, formulated according to nutritional requirements and without any kind of animal by-product or conservatives. This ration was experimentally contaminated with *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium and treated propionic acid in five different concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%) from eighth to 21 days of age. Weight gain, feed intake and feed-to-gain ratio and, simultaneously, to evaluate the efficiency of the propionic acid to reduce and/or eliminate the pathogen from experimental rations in the different acid levels supplemented. The presence of the bacteria was evaluated from cloacal swabs and pool liver, heart and gall bladder of one bird from each experimental replicate. The propionic acid levels applied affect negatively weight gain and quadratic effect for feed-to-gain ratio. Propionic acid concentration of 0.5% determined reduction in *Salmonella* sp. contamination and 1.0, 1.5 and 2.0% of the acid eliminated the bacteria. From the organs pool evaluated, excretas and swab cloacal, the frequency of isolation was 10, 80 and 100%, respectively, to *Salmonella* sp.. Propionic acid was effective to reduce and eliminate *Salmonella* sp.

**Key words:** Bacterial contamination, organic acid, performance, ration.



## INTRODUÇÃO

A alta produtividade na exploração avícola está relacionada aos avanços em genética, manejo, ambiência, nutrição, sanidade e processamento das aves.

Considerando a nutrição e o estado sanitário dos plantéis, pode-se afirmar que o desequilíbrio funcional do trato gastrointestinal proporciona pior desempenho das aves, pelo prejuízo na absorção de nutrientes e alteração da microbiota intestinal (MAIORKA, 2004) favorecendo o desenvolvimento de agentes infecciosos como as salmonelas.

As bactérias estão amplamente distribuídas na natureza e podem infectar o trato intestinal de animais. O gênero *Salmonella* sp. comumente é associado às aves e a veiculação do patógeno ao homem, à cadeia alimentar (GAST, 1997).

Segundo FERREIRA & FERREIRA (2006), a redução de patógenos veiculados por alimentos é primordial para assegurar aos consumidores a qualidade do alimento. Portanto, medidas de controle bacteriano constituem ações preponderantes no desenvolvimento da atividade avícola. Estas medidas envolvem todo o processo de produção das aves, sendo que atenção especial deve ser dispensada no controle microbiológico das rações.

Diante das restrições ao uso de antibióticos promotores de crescimento nas rações pela União Européia, e tendo em vista o mercado internacional de carnes, BELLAVER & SCHEUERMANN (2004) comentaram que alternativas devem ser avaliadas para que os plantéis de aves não tenham o desempenho e o estado sanitário prejudicados.

A qualidade microbiológica das rações destinadas à alimentação das aves constitui fator relevante quando se avalia a contaminação de lotes de aves por *Salmonella* sp. As matérias-primas destinadas à fabricação destas rações podem constituir um excelente meio de introdução do patógeno nas criações avícolas (SONCINI, 2002).

Os ácidos orgânicos são aditivos alimentares considerados como possíveis substitutos aos antibióticos promotores de crescimento, principalmente

quando associados à redução bacteriana do trato digestivo (BELLAVÉR & SCHEUERMANN, 2004).

O tratamento químico das rações contribui para a redução da ocorrência da *Salmonella* sp. na criação avícola e, conseqüentemente, a contaminação de carcaças e a probabilidade em ocorrer surtos de toxinfecção alimentar são reduzidos sensivelmente.

Acredita-se que a atividade antibacteriana desses ácidos na ração depende da sua concentração na dieta e subseqüentemente da sua concentração no trato digestivo. O pH do trato digestivo afeta a proporção de moléculas ácidas não dissociadas presentes (LE NY, 2005) e os cecos são o sítio preferido de colonização de salmonelas. O pH neste segmento do trato gastrointestinal é alto, resultante da fermentação anaeróbica (6,5 - 7,5). Esta característica não favorece o efeito bactericida ou bacteriostático dos ácidos orgânicos, pela não-dissociação da molécula.

O ácido propiônico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ) é considerado um ácido orgânico fraco e um dos mais efetivos em relação ao efeito bactericida, seja em sua forma pura ou de sais de propionato. Quando usado em tratamento de rações, tem sido apontado como responsável pelo melhor desempenho das aves, além de impedir o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas. Apresenta pka 4,87 e em pH 6, a forma não-dissociada encontra-se em apenas 7%.

CANIBE et al. (2001) relataram que a aplicação de ácido propiônico em rações de leitões inibe o crescimento de coliformes e *Salmonella* sp. no segmento proximal do trato gastrointestinal e, possivelmente, a mesma ação pode ser observada em aves.

Diante das considerações relativas a aplicação de ácidos orgânicos na alimentação de aves, sua função inibitória frente as enterobactérias patogênicas às aves e ao homem, e os efeitos potencializadores dos ganhos nutricionais, objetivou-se com o presente estudo, verificar o efeito da aplicação de ácido propiônico em rações experimentalmente contaminadas com *Salmonella* sp. e fornecidas às aves. Para tanto, avaliou-se a recuperação do patógeno e o desempenho das aves alimentadas com ração contendo diferentes concentrações do ácido.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Isolamento do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de novembro a dezembro de 2004.

As análises laboratoriais de isolamento e identificação bacteriana e biologia molecular foram conduzidas no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da UFG.

### Delineamento e Tratamentos

Foram alojados 200 pintos de um dia de idade, machos, de linhagem Cobb. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições de 10 pintos cada, em baterias aquecidas de aço galvanizado.

Inicialmente, os pintos foram pesados em grupos de dez para a composição das parcelas experimentais e distribuídos homoganeamente tendo como base o peso.

Os tratamentos foram caracterizados pela adição de ácido propiônico, a uma ração contaminada por suspensão bacteriana de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, nos níveis de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%; perfazendo cinco tratamentos, respectivamente.

A cada sete dias as aves das parcelas experimentais foram pesadas e a sobra de ração retirada, computada e descontada do total de ração fornecida. Calculou-se então o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar. Também foram anotados os óbitos durante o período de alojamento e descontados durante o período de alojamento.

Antes de ser fornecida a cada lote de pintos, a ração e a água foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* sp.. Os forros de caixa de transporte de pintos foram recolhidos e também submetidos à pesquisa do patógeno. Para todas as amostras, seguiu-se a metodologia descrita em BRASIL (1995).

## Alimentação das aves

A ração fornecida às aves foi formulada, a base de milho e soja, sendo preparada na fábrica da Escola de Veterinária e não havendo incorporação de ingredientes de origem animal ou aditivos. Para todos os tratamentos foi fornecido o mesmo nível de energia (3.122 kcal/kg), assim como o mesmo percentual de proteína (20,87%). Sua composição, para 100 kg, pode ser vista no Quadro 1.

**QUADRO 1.** Composição da ração fornecida às aves.

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Milho	57,078
Farelo de soja	34,538
Óleo vegetal	4,534
Fosfato bicálcico	1,770
Calcário	1,028
DL-Met 99	0,219
L-Lis HCl	0,149
Sal	0,434
Suplemento vitamínico inicial	0,250
Total (%)	100
<b>Composição nutricional calculada</b>	
	<b>Nível</b>
EM	3122 kcal
PB	20,877%
Cálcio	0,939
Fósforo total	0,672
Fósforo disponível	0,441
Potássio	0,511
Sódio	0,216
Fibra	3,261
Gordura	6,679
Ácido linoleico	3,590
Metionina	0,538
Metionina + cistina	0,879
Lisina	1,239
Treonina	0,809
Triptofano	0,277

## Culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium

Culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, estocadas em ágar nutriente, isoladas de amostras de origem aviária foram inoculadas, separadamente, em 10 mL de caldo de enriquecimento Rappaport-

Vassiliadis (RV) e caldo selenito-cistina (SC) e incubadas por 24 horas a 42°C, para multiplicação do agente. Após este período, 0,03 µL foi transferido com auxílio de alça de níquel-cromo, por semeadura em estrias e esgotamento, para ágar Hektoen e ágar Rambach e incubados por 24 horas a 37°C. As unidades formadoras de colônias (UFC), tanto de *Salmonella* Enteritidis quanto de *Salmonella* Typhimurium, foram ressuspensas, separadamente, em 1,0 mL de solução salina a 0,85%, pH 7,0. A suspensão concentrada de bactérias, em volume de 1,0 mL, baseou-se na escala de McFarland, em concentração de 10<sup>2</sup> UFC/mL, para cada sorovar.

De cada parcela experimental, 50 gramas de ração foram recolhidas, acondicionadas em sacos plásticos e contaminadas com 1,0 mL de suspensão de *Salmonella* Enteritidis e 1,0 mL de suspensão de *Salmonella* Typhimurium. A homogeneização ocorreu até a completa absorção do líquido pela ração. Em período posterior a uma hora, estas alíquotas foram incorporadas às respectivas rações, ocorrendo nova homogeneização.

Após 24 horas de contaminação experimental das rações, uma porção de 100 gramas de ração de cada parcela experimental foi recolhida em sacos plásticos individuais esterilizados, devidamente identificados, e encaminhados para isolamento conforme BRASIL (1995). As amostras negativas no isolamento bacteriológico foram analisadas pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para confirmação dos resultados, conforme BEJ et al. (1994).

### **Contaminação e tratamento das rações**

As rações contaminadas foram oferecidas às aves a partir do sétimo dia de alojamento, devido a adaptação na primeira semana de vida, com finalidade de permitir a observação de quaisquer anormalidades que pudessem comprometer o desenvolvimento normal do lote e/ou mascarar a contaminação experimental e/ou o tratamento químico.

Após pesagem das aves, uma porção de 200 gramas de ração, obtida de cada parcela experimental, foi pesada e contaminada com suspensão bacteriana de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Estas porções foram homogeneizadas e incorporadas às rações.

Após 24 horas de contaminação, cada balde teve uma amostra de 100 gramas de ração retirada para pesquisa de *Salmonella* sp.. Neste momento, as rações foram tratadas quimicamente conforme cada tratamento e homogeneizadas.

Decorridas 24 horas de acidificação, o pH foi determinado por meio de homogeneização manual vigorosa por 30 minutos em 50 mL de água destilada. Após repouso por cinco minutos e procedeu-se a leitura em pHmetro digital.

### **Pesquisa de *Salmonella* sp. nas diferentes categorias de amostras**

A pesquisa de *Salmonella* obedeceu o preconizado por BRASIL (1995) e GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com modificações. Dentre as categorias de amostras citam-se:

- forro de caixa de transporte de pintos, duas amostras ;
- ração recém preparada, uma amostra;
- ração não contaminada fornecida às aves durante a primeira semana, 20 amostras;
- ração contaminada fornecida às aves logo após o sétimo dia de vida, 20 amostras;
- *pool* de coração, fígado e vesícula biliar de uma ave, 20 amostras;
- excreta final aos 21 dias de vida, 20 amostras;
- suabe cloacal de uma ave, 20 amostras.

Finalizado o experimento, aos 21 dias de alojamento, uma ave de cada grupo foi sacrificada, identificada e analisada com vistas à presença de lesões anatomopatológicas e pesquisa de *Salmonella* sp. nos órgãos de eleição ou *pool* de coração e fígado associado à vesícula biliar.

### **Isolamento e identificação de *Salmonella* sp. pela técnica bacteriológica convencional**

Os forros de caixa foram identificados, cortados com tesouras esterilizadas, raspados com colheres esterilizadas e as amostras aliquoteadas em sacos plásticos esterilizados. Foram distribuídos dois gramas da amostra em 20 mL de água peptonada tamponada (APT) a 1%, a 37°C por 24 horas. Em

seguida, procedeu-se o enriquecimento seletivo inoculando 1,0 e 0,1 mL, respectivamente, em 10 mL de caldos selenito-cistina (SC) e Rappaport-Vassiliadis (RV), incubando a 42°C por igual período de tempo.

Em relação às rações, após homogeneização da amostra de 100 gramas, transferiu-se 25 gramas para caldo de pré-enriquecimento constituído de 225 mL de água peptonada tamponada (APT) a 1% e incubou-se a 37°C, por 24 horas. Após este período, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram transferidas para 10 mL de SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

Amostras compostas por órgãos foram trituradas, homogeneizadas e fracionadas em unidades de 1,0 e 0,1 grama. A seguir, foram transferidas para 10 mL dos caldos SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

Os suabes cloacais foram transportados embebidos em água peptonada tamponada a 0,1% e submetidos ao pré-enriquecimento em 10 mL de APT a 1,0%, a 37°C por 24 horas. Ato contínuo, 1,0 e 0,1 mL de APT a 1,0% foram transferidos para 10 mL de SC e RV, respectivamente, e incubados a 42°C por 24 horas.

As excretas foram homogeneizadas e transferidas unidades analíticas de 1,0 e 0,1 grama para 10 mL dos caldos SC e RV, respectivamente. A incubação procedeu-se a 42°C, por 24 horas.

Finalizado o período de incubação dos caldos, uma alíquota de 0,03 µL de cada caldo foi transferida com auxílio de alça de níquel-cromo calibrada, para placas de Petri contendo ágar MacConkey (MC) e ágar Hektoen (HK). Procedeu-se à semeadura em superfície por esgotamento em estrias. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Finalizado este período, de cinco a oito unidades formadoras de colônias (UFC) sugestivas de pertencerem ao gênero *Salmonella* foram repicadas em ágar tríplice açúcar ferro (TAF) e incubadas a 37°C, por 18 horas. Quando o número de UFC era inferior a cinco, todas as colônias foram pescadas e submetidas ao mesmo procedimento.

As culturas em ágar tríplice açúcar ferro (TAF) com reações compatíveis para o gênero *Salmonella* sp. foram identificadas bioquimicamente. As provas bioquímicas foram incubadas a 37°C por até sete dias, com leituras diárias.

Das culturas bioquimicamente confirmadas como *Salmonella* sp. foi realizada a prova sorológica com soros polivalentes anti-O e anti-H, realizados a

partir de culturas jovens de 18 horas de incubação em ágar nutriente e ressuspensas em solução salina 0,85%. Após a confirmação sorológica, foram estocadas em ágar nutriente e enviadas ao Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ) para tipagem sorológica.

### **Recuperação bacteriana das rações tratadas quimicamente**

As rações tratadas com as diferentes concentrações do ácido acético foram recolhidas 24 horas após a acidificação. De cada parcela, foram retirados 100 gramas e acondicionados em sacos plásticos esterilizados, identificados individualmente, e posteriormente lacrados. Foram homogeneizados 10 gramas em 90 mL de APT a 1,0%. A partir desta diluição e empregando solução salina 0,85%, foram preparadas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . De cada diluição, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada em superfície em placas de ágar Rambach e incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura das placas baseou-se na diferenciação entre as UFC's de *Salmonella* e outros gêneros conforme GRUENEWALD et al., (1991) e ALBUQUERQUE et al., (1998).

Nas diferentes concentrações do ácido e das quatro repetições foram obtidas quatro diluições seriadas para enumerar o patógeno cujos resultados foram transformados em escores, conforme contagem em placa de Petri de 65 cm<sup>2</sup> (Tabela 1).

**TABELA 1.** Escore de crescimento de *Salmonella* sp. em rações avícolas experimentalmente contaminadas e tratadas quimicamente com ácido acético.

<b>Escore</b>	<b>Observações efetuadas</b>
0	Ausência de crescimento
1	1 a 100 UFC/placa
2	10 a 25 UFC/ cm <sup>2</sup> de placa
3	25 a 100 UFC/ cm <sup>2</sup> de placa
4	Número incontável de UFC, com alteração da coloração do meio

Adaptado de ALBUQUERQUE et al. (1998).



### **Detecção de *Salmonella* sp. pela técnica de PCR**

As amostras negativas para *Salmonella* sp. analisadas pela técnica bacteriológica convencional foram submetidas à detecção do gênero pela técnica de PCR. Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL das culturas nos caldos SC e RV, de todas as amostras cultivadas e acondicionadas em tubos de polipropileno e estocadas a -18°C, para uso posterior.

O DNA genômico foi extraído apenas do caldo SC, uma vez que este apresentou maior eficiência no isolamento bacteriano.

Após descongelamento, os tubos foram centrifugados a 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 567 µL de tampão Tris-EDTA (TE), pH 8,0. A lise foi realizada com 30 µL de dodecyl sulfato de sódio (SDS) a 10%, seguindo-se homogeneização vigorosa e incubação a 37°C por uma hora em banho-Maria. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de NaCl a 5M. Após homogeneização vigorosa foram adicionados 80 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) a 10%, pré-aquecido a 65°C. Homogeneizou-se vigorosamente e incubou-se a 65°C por 10 minutos. À solução anterior, adicionou-se 700 µL em igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C (AUSUBELL et al., 1993).

O sobrenadante foi transferido para novo tubo, igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado e a centrifugação realizada conforme já descrito. Este procedimento foi repetido até o desaparecimento completo da interface esbranquiçada. Uma vez finalizada a purificação a precipitação do DNA foi realizada com o uso de etanol PA gelado, na proporção de 2 a 3 vezes o volume do sobrenadante e incubação a -18°C por 24 horas.

Finalizado este período, seguiu-se centrifugação a 10.000 rpm a durante 10 minutos. O álcool foi descartado vertendo-se o tubo cuidadosamente para que não houvesse descarte do DNA. Os tubos foram novamente acrescidos de etanol PA, submetidos a -18°C por 20 horas.

Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente e nova precipitação realizada conforme descrito. Uma vez centrifugadas, as amostras foram tratadas com álcool 70% gelado. O álcool foi

descartado e o *pellet* seco ao ar. O DNA foi ressuspendido ou hidratado com tampão TE, pH 8,0.

A determinação da concentração de DNA do material extraído foi realizada por eletroforese, em gel de agarose.

Para a amplificação, 5,0 µL da amostra extraída foi incorporada aos reagentes da reação. Para tanto, foram utilizadas as concentrações de 50 mM TrisCl (pH 8,9), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP's, 0,5 µM dos *primers* SHIMA – L e SHIMA – R (BEJ et al, 1994); água milli-Q; 2,5 U de Taq polimerase. O *primer* SHIMA-L tem a descrição (5'-CGT-GCTCTGGAAAACGGTGAG-3') e o SHIMA-R 5'-CGTGCTGTAATAGGAATATCTTCA-3'.

O produto desta mistura para amplificação foi submetido a 35 ciclos de amplificação com desnaturação por 3 minutos a 94°C; 35 ciclos compostos por três etapas de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C e 30 segundos a 72°C. Uma etapa final de todo o ciclo de amplificação de 3 minutos a 72°C, sendo a extensão final conforme preconizado por BEJ et al. (1994). A amplicon desta reação apresenta 122 pares de base.

Foram utilizados controles positivos formados por culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Os controles negativos utilizados foram o complexo da reação sem *primer*. Dos produtos do PCR ou amplicons foi retirada uma alíquota de 10 µL para a eletroforese em gel de agarose a 1,0% em TBE durante 40 minutos a 9 V/cm. Após coloração do gel com brometo de etídeo, procedeu-se a observação em transiluminador de luz ultravioleta (BEJ et al., 1994).

### **Avaliação de desempenho**

Todas as aves e rações das parcelas experimentais foram pesadas no primeiro, sétimo, 14<sup>º</sup> e 21<sup>º</sup> dias de vida. Em caso de morte, o peso da ave foi registrado para posterior correção do peso final da parcela, bem como do consumo de ração e da conversão alimentar.

O peso final foi obtido pelas médias das parcelas. O consumo de ração calculado pela diferença entre a quantidade de ração fornecida, sobras e amostras retiradas, e a conversão alimentar pela relação entre o consumo e o

ganho de peso. Para a avaliação das variáveis considerou-se o período de 8 a 21 dias de idade, ocasião em que ocorreu a contaminação e acidificação das rações, respectivamente.

### **Análises estatísticas**

Os dados referentes ao desempenho foram submetidos à análise de regressão polinomial pelo programa UFV/SAEG (2001), versão 9.0. A análise dos dados de isolamento e recuperação de *Salmonella* sp. baseou-se na frequência de observação do patógeno e na estimativa de *escores*, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes à detecção de *Salmonella* sp. em diferentes fontes, pelas técnicas de isolamento bacteriano convencional (IBC) e reação em cadeia pela polimerase (PCR), em fase anterior ao alojamento dos pintos. Somente foram analisadas pelo PCR amostras negativas ao ICB.

**TABELA 2.** *Salmonella* sp. em diferentes fontes avaliadas anteriormente ao alojamento das aves.

Fonte	IBC	Sorovar	PCR
forro de caixa de transporte de pintos	0/1		0/1
ração recém preparada	1/1	<i>Salmonella</i> Panama	NR
ração não contaminada	16/20	<i>Salmonella</i> Enteritidis (1/16) <i>Salmonella</i> Panama (1/16) <i>Salmonella</i> Typhimurium (14/16)	0/4
ração contaminada experimentalmente sem acidificante	20/20	<i>Salmonella</i> Panama (2/20) <i>Salmonella</i> Typhimurium (18/20)	NR
Positivas/total	17/22		0/5
(%) positivas	77,27		0

NR = análise não realizada

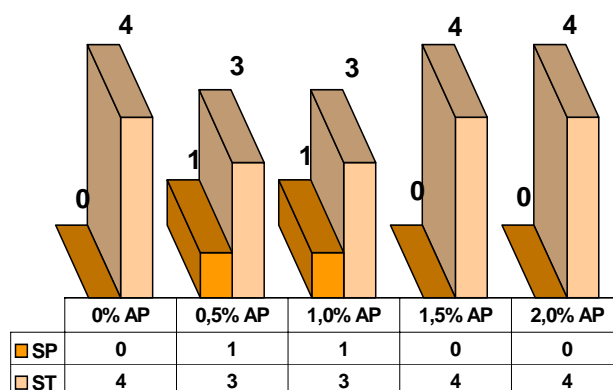
Analisando a Tabela 2, verifica-se que na partida de ração preparada para a alimentação dos pintos identificou-se a presença de *Salmonella* Panama.

Das 20 amostras de rações não contaminadas, 16 (80%) foram positivas para *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Panama (SP), nas proporções de 1/16, 14/16 e 1/16, respectivamente.

Após a contaminação experimental das rações com ST e SE, 100% das amostras apresentaram resultado positivo ao gênero *Salmonella*, sendo a frequência de sorovares de 18/20 para ST e 2/20 para SP; não foi observado isolamento para SE. É provável que tenha ocorrido competição entre os sorovares e que SE e SP. Há a possibilidade de SE ser menos suscetível à adaptação em meio com baixa atividade de água e maior percentual de óleos.

Pode-se verificar também que nas parcelas experimentais, SP foi identificada somente em 10% das amostras. Este sorovar apesar de não ter sido inoculado experimentalmente foi identificado como contaminante da ração

preparada. Aos sete dias do experimento, as amostras continuavam positivas ao mesmo sorovar e a dois outros sorovares, SE e ST (Figura 1).



**FIGURA 1.** Presença de *Salmonella* Panama (SP), *Salmonella* Typhimurium (ST) em rações experimentalmente contaminadas por ST e SE e não tratadas com ácido propiônico.

A presença destes sorovares nas rações pode ser explicada, em parte, pela utilização de milho ou soja contaminados na fabricação da ração. Segundo KUANA (2000) existe a possibilidade de contaminação de matérias-primas de origem vegetal serem responsáveis pela introdução de salmonelas na exploração aviária.

É também provável que esta contaminação tenha se acentuado durante o armazenamento da ração na própria fábrica, pela presença de formigas, moscas, baratas, pássaros ou roedores. DAVIES & WRAY (1995) e HENZLER & OPITZ (1999) relataram que mesmo adotando práticas higiênico-sanitárias adequadas, a contaminação pode ocorrer sutilmente por agentes de difícil controle. Torna-se importante ressaltar, no entanto, que mesmo adotando-se rigor nas práticas experimentais, o presente estudo esteve sujeito à contaminação externa, à semelhança do que ocorre em condições reais na indústria avícola.

Na Tabela 3 pode-se observar a detecção de *Salmonella* sp. pelo IBC e pelo PCR em excretas.

**TABELA 3.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) de excretas de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Excretas					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e PCR)
0% de AP	4/4	100	SP* (4/4) ST (2/4)	NR	-	100
0,5% de AP	4/4	100	SP (2/4) ST (1/4) SS (1/4)	NR	-	100
1,0% de AP	2/4	50	ST (2/4)	2/2	100	100
1,5% de AP	0/4	0	-	4/4	100	100
2,0% de AP	0/4	0	-	0/4	-	0
<b>Total</b>	<b>10/20</b>	<b>50</b>		<b>6/10</b>	<b>60</b>	<b>80</b>

\* - *Salmonella* Panama (SP), *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Seftenberg (SS).  
NR – análise não realizada.

Verifica-se que *Salmonella* sp. foi detectada apenas nos grupos de aves correspondentes aos níveis 0 e 0,5% de ácido propiônico pelo IBC, apresentando uma frequência de isolamento de 50%. A bactéria foi detectada pelo PCR em 60% das amostras relacionando-se aos níveis de 1,0 e 1,5% de ácido propiônico. Estes resultados confirmam a alta taxa de excreção de *Salmonella* sp. para os níveis de 0 a 1,5% de ácido. Estes resultados concordam com Van IMEERSEEL et al. (2004) quando relataram que a concentração de 0,27% de ácido propiônico em rações não é eficiente para reduzir salmonelas dos cecos das aves quando comparada a rações sem acidificante. Nota-se que não ocorreu excreção fecal de salmonelas no nível de 2,0% de ácido propiônico. Este resultado assemelha-se parcialmente com os de MALICKI et al. (2004) quando afirmaram que a incorporação de 1,2% de ácido propiônico em farinhas de peixe contaminadas por enterobactérias inibiu o crescimento das principais bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

Os dados deste estudo contrastam com as descrições de McHAN & SHOTTS (1992) e COX et al. (1994) quando reportaram que ácido propiônico é eficiente em reduzir *Salmonella* sp. nos cecos das aves e, por consequência, a excreção fecal do patógeno. Pelas descrições de HUME et al. (1993) há similaridade entre estas ponderações e ao fato da inibição do patógeno estar relacionada a períodos recentes de acidificação. No entanto, a redução ou eliminação não é suficiente para impedir a disseminação do agente entre as aves.

Relativamente aos *pools* de órgãos verifica-se, na Tabela 4, que nos níveis 0 e 0,5% de ácido, *Salmonella* Typhimurium foi detectada pelo ICB.

**TABELA 4.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) para *pool* de coração, fígado e vesícula biliar de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Pool de órgãos					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e PCR)
0% de AP	1/4	25	ST*	0/3	0	25
0,5% de AP	1/4	25	ST*	0/3	0	25
1,0% de AP	0/4	0	-	0/4	0	0
1,5% de AP	0/4	0	-	0/4	0	0
2,0% de AP	0/4	0	-	0/4	0	0
<b>Total</b>	<b>2/20</b>	<b>10</b>		<b>0/20</b>	<b>0</b>	<b>10</b>

\* - *Salmonella* Typhimurium (ST)

À necropsia nenhuma alteração macroscópica de órgãos e vísceras, sugestivas de salmonelose, foi observada. Nos tratamentos referentes aos níveis de 1,0, 1,5 e 2,0% de ácido propiônico não foi detectado o agente pelo PCR.

A Tabela 5 apresenta dados referentes ao isolamento e detecção de *Salmonella* sp. em suabes cloacais para os diversos tratamentos.

**TABELA 5.** Detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriano convencional (IBC) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em suabes cloacais de frangos aos 21 dias de idade.

Tratamento	Pool de órgãos					
	IBC	Positivas (%)	Sorovar	PCR	Positivas (%)	Total Positivas (IBC e PCR)
0% de AP	4/4	100	SP* (2/4) ST (2/4) SE (1/4)	NR	-	100
0,5% de AP	4/4	100	SP (2/4) ST (2/4)	NR	-	100
1,0% de AP	4/4	100	SP (1/4) ST (3/4)	NR	-	100
1,5% de AP	3/4	75	SP (2/4) ST (1/4)	1/1	100	100
2,0% de AP	3/4	75	SP (2/4) ST (1/4)	1/1	100	100
<b>Total</b>	<b>18/20</b>	<b>90</b>		<b>2/2</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\* - *Salmonella* Panama (SP), *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Enteritidis (SE).  
NR – análise não realizada.

Nota-se em suabes cloacais 90% de positividade quando analisados pela técnica bacteriológica convencional e 100% pelo PCR, permitindo afirmar que foi detectada *Salmonella* sp. em 100% destas amostras. Depreende-se, também, a ocorrência de excreção do patógeno em todas as parcelas experimentais, ao final de 21 dias de alojamento.

Diante desses resultados há que considerar os relatos de THOMPSON & HINTON (1997) referentes a maior ação do ácido propiônico sobre o trato gastrointestinal superior, ou seja, papo, proventrículo e moela, em função do tratamento de rações. Além disso, estes autores comentam os resultados de BOLTON & DEWAR (1964) que comprovam a completa digestão do sal de ácido propiônico a 2,5%, na região anterior ao divertículo de Meckel. No entanto, correlacionando o isolamento de salmonelas de excretas e suabes, na fase final do experimento e a completa eliminação do agente das rações nos níveis de 1,0, 1,5 e 2,0% 24 horas após a acidificação, observa-se concordância com as considerações de HUMPPHREY & LANNING (1988) citados por PENZ JÚNIOR et al. (1993). Estes autores citaram que a maior eficiência dos ácidos é observada na fase próxima à sua incorporação na ração, ocorrendo recontaminação dos cecos caso não haja nova incorporação destas substâncias.

Os resultados do presente estudo, relacionados à recuperação de salmonelas de aves alimentadas com rações contaminadas e tratadas com ácido propiônico, estão em acordo com os de HUME et al. (1993) os quais afirmaram que somente uma pequena porção do ácido presente na ração é capaz de alcançar os cecos e parte final do trato digestivo. Assim, a escassez do ácido possibilita a recolonização dos cecos pela bactéria. Tais relatos explicam a alta taxa de recuperação de *Salmonella* sp. dos suabes cloacais.

Tendo por base a complementariedade das técnicas de diagnóstico empregadas neste estudo, observa-se na Figura 2 um padrão de resultados para amostras positivas, negativas, controles positivo e negativo.

Conforme as descrições de PERSING (1991) quanto ao grau de contaminação de amostras analisadas pelo PCR e interrelacionando estas descrições àquelas encontradas neste ensaio; ainda, frente às considerações de CHEN et al. (2000) quanto à possibilidade de reações que não somente para o gênero *Salmonella* para o *primer* SHIMA e considerando os resultados de BEJ et al. (1994) é interessante ressaltar que ocorreu alta sensibilidade e especificidade



do *primer* empregado para a técnica de PCR. Portanto, as reações inespecíficas observadas na Figura 2 estão previstas e não invalidam os resultados.



**FIGURA 2.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Na canaleta 1 está o padrão de peso molecular (DNA *ladder* 100pb). Na canaleta 2 está o controle positivo de *Salmonella* (*Salmonella* Typhimurium isolada de carcaça de frango). Na canaleta 3 está outro controle positivo (*Salmonella* Enteritidis isolada de carcaça de frango). Nas canaletas 5 e 14 encontram-se os controles negativos, nas canaletas (4, 6, 7, 8 e 9) encontram-se amostras positivas e nas demais canaletas (10, 11, 12 e 13) encontram-se amostras negativas.

Interrelacionando os valores de pH das rações após a adição de ácido propiônico e sabendo que seu pKa é 4,87, pode-se afirmar que o ácido estava em torno de 7% não-dissociado, conforme LE NY (2005). Mesmo assim, nas diferentes concentrações empregadas neste ensaio, o mesmo mostrou-se eficiente. Na Tabela 6, estão distribuídos os valores de pH das rações tratadas e não tratadas com ácido propiônico em diferentes concentrações. Observa-se que os valores de pH não são os ideais quando considera-se o grau de não-dissociação do ácido e a faixa adequada para a sobrevivência e crescimento de salmonelas.

**TABELA 6.** Valores de pH das rações em período de 24 horas após a adição de ácido propiônico (AP) em suas diferentes concentrações.

Bateria 1	pH	Bateria 2	pH	Bateria 3	pH	Bateria 4	pH	Médias de pH
sem AP	6,8	sem AP	6,9	sem AP	7,1	sem AP	6,9	<b>6,92</b>
0,5% AP	6,8	0,5% AP	6,1	0,5% AP	6,5	0,5% AP	6,5	<b>6,47</b>
1,0% AP	6,1	1,0% AP	6,0	1,0% AP	6,3	1,0% AP	6,5	<b>6,22</b>
1,5% AP	6,1	1,5% AP	5,9	1,5% AP	6,0	1,5% AP	6,1	<b>6,02</b>
2,0% AP	5,7	2,0% AP	5,9	2,0% AP	6,0	2,0% AP	6,0	<b>5,90</b>

A Tabela 7 apresenta os escores de crescimento de salmonelas quando analisadas as quatro repetições dos cinco tratamentos. Nota-se que os tratamentos nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0% de ácido propiônico foram eficientes em eliminar *Salmonella* sp.

**TABELA 7.** Escore de *Salmonella* sp. nas quatro diluições de amostras de ração contaminada e tratada com níveis crescentes de ácido propiônico (AP).

Tratamento		Escore de <i>Salmonella</i> sp. para as quatro repetições			
		Diluições das quatro repetições de cada tratamento			
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
0% de AP	R1	3	2	2	0
	R2	4	3	1	0
	R3	3	3	1	0
	R4	4	4	1	0
0,5% de AP	R1	1	1	0	0
	R2	1	0	0	0
	R3	1	0	0	1
	R4	1	1	1	0
1,0% de AP	R1	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0
	R3	0	0	0	0
	R4	0	0	0	0
1,5% de AP	R1	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0
	R3	0	0	0	0
	R4	0	0	0	0
2,0% de AP	R1	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0
	R3	0	0	0	0
	R4	0	0	0	0

R - repetição dos tratamentos

10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> correspondem às diluições seriadas

Legenda do escore de crescimento bacteriano:

0 = ausência de crescimento; 1 = 1 a 100 UFC por placa; 2 = 10 a 25 UFC por centímetro quadrado da placa; 3 = 25 a 100 UFC por centímetro quadrado da placa e 4 = número incontável de UFC, com alteração da coloração do meio.

Analisando a Tabela 7, observa-se que à concentração de 0,5% ocorre redução do patógeno sem que haja sua eliminação. E que grupo de aves alimentadas com ração não tratada apresenta elevada taxa de unidades formadoras de colônias de salmonelas nas quatro diluições.

Os resultados do presente estudo reforçam as afirmações de LE NY (2005) quando o autor mencionou a concentração inibitória mínima de ácido propiônico para *Salmonella* Typhimurium - sorovar mais resistente à acidificação – como sendo de 0,15% em pH 5,0. Neste valor de pH, 42% do ácido encontra-se em sua forma não-dissociada, aumentando sua ação bactericida.

No que se refere as variáveis de desempenho das aves, na Tabela 8 pode-se observar os resultados conforme a concentração de ácido propiônico.

**TABELA 8.** Peso inicial (PI), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), peso final (PF) e conversão alimentar (CA) de frangos alimentados com rações contaminadas experimentalmente por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium contendo níveis crescentes de ácido propiônico (AP), período de 8 a 21 dias de idade.

Nível de AP	PI	CR	GP	PF	CA
0	184	1200	781	965	1,540
0,5%	184	1199	779	963	1,540
1,0%	183	1200	782	966	1,533
1,5%	183	1197	781	964	1,533
2,0%	184	1197	780	964	1,538
Efeito*	ns	L	ns	ns	Q
R <sup>2</sup>	-	0,83	-	-	0,65
Probabilidade	>0,5	0,12	>0,5	>0,5	0,42
CV (%)	0,99	0,17	0,41	0,23	0,48

\* CR: L – efeito linear negativo ( $Y = 1200,3 - 1,69x$ )

CA: Q – efeito quadrático ( $Y = 1,54 - 0,0013x + 0,005x^2$ )

ns: não significativo

Analisando estes resultados, observa-se que para peso inicial, ganho de peso e peso final não houve diferença significativa.

Outrossim, tendo em vista o peso final, é interessante comparar estes resultados com as descrições de PENZ JÚNIOR et al. (1993) quando comentaram a respeito dos achados de RYS & KORELESKI (1974) para esta variável em frangos de 1 a 28 dias de idade, frente à administração de 2% do ácido propiônico em ração. Esses autores identificaram que nesta

concentração o ácido prejudicou a disponibilidade da vitamina B<sub>12</sub>, aumentando a exigência das aves quanto à absorção de nutrientes.

Com relação ao consumo de ração, pode-se verificar efeito linear negativo ( $Y = 1200,3 - 1,69x$ ). Observou-se, portanto, que as concentrações crescentes de ácido propiônico avaliadas no presente estudo, diminuíram o consumo de ração, podendo ser devido à menor palatabilidade da mesma. É oportuno ressaltar que nesta fase de vida, principalmente, não é interessante que o consumo de ração seja diminuído. Em parte, esses resultados são similares às afirmações de CAVE (1982) quando descreveu em frangos o efeito negativo proporcionado pelo emprego do ácido propiônico para o consumo de ração.

Tendo em vista, os valores encontrados para a conversão alimentar, observou-se efeito quadrático. Derivando a equação encontrada ( $Y = 1,54 - 0,0013x + 0,0005x^2$ ) obteve-se o valor de 1,3% de ácido propiônico para a concentração que proporciona o ponto de mínima conversão alimentar ou melhor conversão observada.

## CONCLUSÕES

Tendo em vista, os resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

1. O ácido propiônico em concentração de 0,5% reduziu a contaminação de *Salmonella* sp. em ração contaminada experimentalmente;
2. A presença do ácido propiônico em rações nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% alterou negativamente o consumo de ração;
3. Nas condições experimentais deste estudo, ácido propiônico nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0% foi efetivo em eliminar *Salmonella* sp. de rações contaminadas experimentalmente.
4. As concentrações de 1,0 e 1,5% de ácido propiônico em rações contaminadas não impediram a excreção fecal de *Salmonella* sp..

## REFERÊNCIAS

1. ALBUQUERQUE, R., ITO, N. M. K., MIYAJI, C. I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bactericida e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella* spp. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 35, n.6, p.279-282, 1998.
2. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SMITH, J.A., SIDEMAN, J.G., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley e Sons, Unc, New York: p.18-21, 1987.
3. BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. 2004. [www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_arquivos/palestras\\_K5m39r0c.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_arquivos/palestras_K5m39r0c.pdf). Acesso em 3 de maio de 2005.
4. BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H.; BOYCE, M. J.; ATLAS, R. M. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p.-368-373, 1994.
5. BRASIL. Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*)**. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Brasília, n.212, p.17694-17698, de 06 de novembro. Seção I, 1995.
6. CANIBE, N.; ENGBERG, R. M.; JENSEN, B. B. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. 2001. [On line]. [www.afac.slu.se/workshop%20norge/proceedings%20Oslo.htm](http://www.afac.slu.se/workshop%20norge/proceedings%20Oslo.htm) - Acesso em 23 de Janeiro de 2006.
7. CAVE, N. A. G. Effect of dietary short and medium chain fatty acids on feed intake by chicks. **Poultry Science**, v. 61, p.1147-1152, 1982.
8. CHEN, W.; MARTINEZ, G.; MULCHANDANI, A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. **Analytical Biochemistry**, v. 280, p.166-172, 2000.
9. COX, N. A.; McHAN, F.; BAILEY, J. S. Effect of butyric or lactic acid on the *in vivo* colonization of *Salmonella typhimurium*. **The Journal of Applied Research**, v. 3, p.315-318, 1994.
10. DAVIES, R. H.; WRAY, C. Mice as carriers of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units. **The Veterinary Record**, v.30, p.337-341, 1995.

11. FERREIRA, A. P.; FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2006 Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p.56-69, 2006.
12. GAST, R.K. Paratyphoid Infections. In: **CALNEK, B.W. et al.** Diseases of Poultry, **10 ed.** Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 97-121.
13. GEORGIA POULTRY LABORATORY. Monitoring and detection of Salmonella in the poultry and poultry environments, **Oakwood, 1997.** **Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p. [Workshop].**
14. GRUENEWALD, R.; HENDERSON, R. W.; YAPPOW, S. Use of rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.10, p.2354-2356, 1991.
15. HUME, M. E.; CORRIER, D. E.; IVIE, G. W.; DELOACH, J. R. Metabolism of C 14 propionic acid in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, p.786-793, 1993.
16. KUANA, S. Pontos críticos de controle de Salmonella em fábricas de rações. In: **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS**, Campinas, 2000. **Anais...** Campinas: CBNA, p.221-238, 2000.
17. 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-PR, 2005, p.158-165.
18. MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2004. Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p.119-129, 2004.
19. MALICKI, A., ZAWADZKI, W., BRUZEWICZ, S., GRACZYK, S. CZERSKI, A. Effect of formic and propionic acid mixture on *Escherichia coli* in fish meal stored at 12°C. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.3, n.6, p.353-356, 2004.
20. McHAN, F.; SHOTTS, E. B. Effect of feeding selectes short-chain fatty acids on the in vivo attachment of *Salmonella typhimurium* in chick ceca. **Avian Disease**, v. 36, p.139-142, 1992. [Resumo].
21. PENZ JÚNIOR, A. M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos. **Anais...** Santos-SP, 1993, p. 111-119.
22. PERSING, D. H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1281-1285, 1991.

23. ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; FERREIRA, A.S.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C. **Tabela Brasileira para Aves e Suínos. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. Viçosa:Editora UFV, 2000.141p.
24. SAEG®. Sistema para análises estatísticas. UFV, 2001.
25. SONCINI, R. A. Controle de *Salmonella* Enteritidis na Avicultura. In: II SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2002 Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 6 p., 2002.
26. THOMPSON, J. L.; HINTON, M. Antibacterial activity of formic acid and propionic acids in diets of hens salmonellas in the crop. **British Poultry Science**, v. 38, p.59-65, 1997.
27. Van IMMERSEEL, F.; FIEVEZ, 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.



## **CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A qualidade sanitária do frango é fator relevante para saúde pública. A veiculação de doenças entre animais e homens é tema atual e de preocupação global do ponto de vista técnico-científico e comercial. Enquadra-se neste contexto todo um complexo agroindustrial de criação de aves e de comercialização nacional e internacional de carnes.

A prevenção e o controle das salmoneloses na indústria avícola consistem em adotar medidas que evitem a transmissão horizontal e vertical entre os plantéis com consequência direta para segurança alimentar, que por sua vez está relacionada à prevenção de contaminação em seu processo de produção e produtos acabados.

Medidas adotadas para contenção do agente em todos os segmentos da atividade, associadas às boas práticas de fabricação e análise de perigos e pontos críticos de controle, são necessárias, mas tornam-se ineficientes caso não sejam consideradas como prioridade na rotina da exploração avícola. A qualidade microbiológica das rações é fator preponderante para o bom desenvolvimento das aves e para o sucesso das medidas de biossegurança.

Ainda, a busca pela redução ou eliminação de agentes patogênicos associada ao melhor desempenho das aves, direcionou a indústria à adoção de práticas como a utilização de agentes promotores de crescimento. Porém uma nova realidade surge para a exploração avícola. A partir de janeiro deste ano, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (AGP) na alimentação animal foi banido pela União Européia. Estas substâncias devem, portanto, estar ausentes em rações de aves importadas para os países afins. Acrescenta-se ainda o fator de que este bloco comercial é formador de opinião influenciando importantes importadores como os blocos asiáticos e do Oriente Médio.

Tendo em vista as questões sanitárias e comerciais, cientistas e indústria buscam por procedimentos alternativos aos AGP's cuja ação proporcione melhor desempenho das aves, com atenção à redução e/ou eliminação de salmonelas em rações.

Assim sendo, ácidos orgânicos, empregados isoladamente ou em associação de dois ou mais ácidos, vêm sendo largamente divulgados como uma promessa de melhoria nutricional e sanitária dos plantéis de aves.

Estas considerações determinaram o presente estudo e a partir dos experimentos executados, foi possível constatar que ácidos orgânicos não apresentaram similaridade quanto aos resultados divulgados em outras pesquisas, reforçando a obrigatoriedade de considerar as condições ambientais, de concentração e colonização do agente, permanência do contato ácido/agente patogênico e medidas higiênico-sanitárias auxiliares ao manejo.

Também constatou-se que ácidos orgânicos podem promover redução e eliminação bacteriana o que não significa dizer que deva estar em altas concentrações. Ainda, ácidos acético e fórmico em rações não apresentaram resultados satisfatórios que determinem sua eleição como acidificantes inibidores de *Salmonella* sp. em condições semelhantes àquelas preconizadas neste estudo. Também não determinaram melhor desempenho zootécnico das aves.

Porém, quanto ao emprego de ácido propiônico, para estes fins, constatou-se que o mesmo foi eficiente na eliminação de *Salmonella* sp. em concentração igual ou superior a 1,0%, no entanto, não explicitou efeito promotor de crescimento nos primeiros 21 dias de vida dos pintos.

Dentre os três ácidos testados, ácido propiônico revelou melhores resultados para redução e eliminação de *Salmonella* sp. em rações contaminadas.

Com relação aos sorovares estudados, é oportuno considerar, como interesse para pesquisa, a possível suscetibilidade de *Salmonella* Enteritidis em ambientes com teor lipídico acentuado, tomando-se por base os resultados negativos para detecção do agente experimentalmente inoculado. Quanto ao sorovar *Salmonella* Typhimurium sua tolerância e adaptação a ambiente hostil para a maioria dos sorovares de *Salmonella* e Enterobactérias é fator preocupante para a sanidade dos plantéis de aves e saúde pública, o que reforça seu caráter de emergente.

Nesse sentido, é interessante o desenvolvimento de estudos empregando concentrações intermediárias àquelas utilizadas neste ensaio. Isto permitirá realizar comparações relativas à ação bacteriostática, bactericida e de promotor de crescimento. Ainda, o estudo destes ácidos quanto ao emprego em

ingredientes é outra possibilidade a ser considerada; assim como sua utilização em associação de dois ou mais ácidos orgânicos.

Todavia não se pode excluir a importância de ações conjuntas e medidas efetivas de um programa preventivo consistente para a avicultura.