

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

**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA
(*Myrciaria cauliflora*) NO CONTROLE DE *Salmonella* Heidelberg NA
PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

Angélica Ribeiro Araújo Leonídio

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

GOIÂNIA

2018



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Angélica Ribeiro Araújo Leonídio

Título do trabalho: Utilização do extrato etanólico de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) no controle de *Salmonella* Heidelberg na produção de frangos de corte

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 19 / 11 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

- Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente
 - Submissão de artigo em revista científica
 - Publicação como capítulo de livro
 - Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

ANGÉLICA RIBEIRO ARAÚJO LEONÍDIO

**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA
(*Myrciaria cauliflora*) NO CONTROLE DE *Salmonella* Heidelberg NA
PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

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

Área de concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de
Alimentos

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Auxiliadora Andrade

Comitê de Orientação:

Prof^ª. Dr^ª. Regiani Nascimento Gagno Pôrto –
EVZ/UFG

Dr^ª. Leila Maria Leal Parente

GOIÂNIA
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro Araújo Leonídio, Angélica

Utilização do extrato etanólico de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) no controle de *Salmonella Heidelberg* na produção de frangos de corte [manuscrito] / Angélica Ribeiro Araújo Leonídio. - 2018. cxv, 115 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Auxilidora Andrade; co-orientadora Dra. Regiani Nascimento Gagno Pôrto; co-orientador Dr. Leila Maria Leal Parente.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Cidade de Goiás, 2018.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. aditivos. 2. avicultura. 3. desempenho. 4. imunidade. 5. salmonelose. I. Andrade, Maria Auxilidora, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO 260 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Angélica Ribeiro Araújo**
4 **Leonídio**. Às 09h00min do dia 23/05/2018 reuniu-se na Sala de defesas do Programa de Pós-
5 graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de
6 Goiás, Campus II Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada
7 para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-
8 Graduando (a) **Angélica Ribeiro Araújo Leonídio**, intitulada “**Utilização do extrato etanólico de**
9 **Myrciaria Cauliflora no controle de Salmonella Heidelberg na produção de frangos de corte**”,
10 apresentada para obtenção do **Título de Doutor em Ciência Animal**, junto à Área de
11 Concentração: **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos** desta Universidade. O
12 Presidente da Comissão Julgadora **Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade**, iniciando os
13 trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Angélica Ribeiro Araújo Leonídio** para
14 exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra,
15 pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a argüir o (a) candidato (a),
16 durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder
17 aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
18 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a)

19 **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

20 Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade aprovada
21 Prof. Dr. Paulo Ricardo da Costa Leite Aprovada
22 Profa. Dra. Mônica Maria de Almeida Brainer Aprovada
23 Profa. Dra. Dunya Mara Cardoso Moraes Aprovada
24 Profa. Dra. Fabyola de Barros Carvalho Aprovada

25 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Angélica**
26 **Ribeiro Araújo Leonídio**, habilitada [(**Habilitado (a) ou não Habilitado (a)**)]
27 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33

34

35

36

37

38

39 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

40 Utilização do extrato etanólico de fabricado
41 (*Myrciaria cauliflora*) no controle de *Salmonella*
42 *Heidelberg* na produção de frangos de corte

43

44

45

46 Nada mais havendo a tratar, eu Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade, lavrei a presente ata que,
47 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

48 Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

49 Prof. Dr. Paulo Ricardo da Costa Leite

50 Profa. Dra. Mônica Maria de Almeida Brainer

51 Profa. Dra. Dunya Mara Cardoso Moraes

52 Profa. Dra. Fabyola de Barros Carvalho

M. Andrade
P. R. da Costa Leite
Mônica M. de A. Brainer
Dunya Mara Cardoso Moraes
F. B. de Barros Carvalho

Ao meu amado filho Heitor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por me permitir alcançar mais este sonho, sempre me sustentando nos momentos difíceis e me dando coragem para sempre avançar.

Ao meu marido Álvaro pelo amor, apoio e paciência. Foram muitos os momentos de saudade e ausência, mas juntos superamos todas essas dificuldades. Essa vitória é nossa.

Aos meus pais Ellen e Valtuir pelo amor incondicional e por sempre me incentivarem a ir além. Tudo que conquistei na minha vida foi mérito de vocês.

À Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade pela orientação e ensinamentos que ao longo destes nove anos me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente. Saiba que tenho imensa satisfação e orgulho de tê-la tido como mentora.

Aos meus queridos colegas de pós-graduação, pessoas que convivi ao longo desses anos e com quem tive o prazer de compartilhar conhecimentos e experiências que tanto contribuíram na minha formação. Em especial, agradeço à minhas amigas Ana Maria, Samantha, Raiana, Dunya e Adriana pela dedicação durante as etapas mais exaustivas dos meus experimentos. Jamais poderei retribuir tudo que fizeram por mim.

À colega Dr^a. Janaina Moreira, por ter cedido gentilmente o material necessário à realização desta pesquisa. Agradeço também a Me. Amanda Carneiro, pelo precioso auxílio durante a realização de análises.

Às minhas co-orientadoras, Prof^a. Dr^a. Regiani Nascimento Gagno Pôrto e Dr^a. Leila Maria Leal Parente, pela orientação e disponibilidade que sempre dispuseram.

Ao setor de Medicina Veterinária Preventiva, em especial para os colaboradores Dorinha, Nazaré e Helton que contribuíram grandemente para a conclusão deste trabalho.

Aos professores da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás por todos os ensinamentos ao longo dos anos de graduação e pós-graduação.

Ao Dr. Roberto Moraes Jardim Filho pela ajuda indispensável para a realização dos experimentos. Às professoras Dr^a. Dâmaris Silveira, Dr^a. Flávia Oliveira Abrão Pessoa e Dr^a. Patricia Faquinello pelo auxílio e preciosos conselhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela oportunidade e apoio concedidos.

Muito Obrigada!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.”

Augusto Branco

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 <i>Salmonella</i> sp..... | 3 |
| 2.2 <i>Salmonella</i> sp. na produção de frangos de corte | 4 |
| 2.3 Resposta imunológica das aves contra <i>Salmonella</i> sp..... | 7 |
| 2.4 Aditivos fitogênicos e suas propriedades biológicas..... | 8 |
| 2.5 <i>Myrciaria cauliflora</i> | 12 |
| REFERÊNCIAS | 14 |
| CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (<i>Myrciaria cauliflora</i>) FRENTE CEPAS DE <i>Salmonella enterica</i> | 25 |
| INTRODUÇÃO..... | 27 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| Obtenção e processamento do resíduo..... | 29 |
| Preparação dos inóculos bacterianos | 30 |
| Padrão do ácido elágico..... | 30 |
| Verificação da contaminação do extrato etanólico..... | 30 |
| Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 30 |
| Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço | 31 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| CONCLUSÃO..... | 38 |
| REFERÊNCIAS | 39 |
| CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (<i>Myrciaria cauliflora</i>) EM OVOS FÉRTEIS E PINTOS INFECTADOS COM <i>Salmonella</i> HEIDELBERG | 42 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO..... | 44 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 46 |
| Delineamento Experimental | 46 |
| Preparação do inóculo | 46 |
| Obtenção do extrato etanólico de cascas e sementes <i>Myrciaria cauliflora</i> | 46 |
| Inoculação dos ovos | 47 |
| Análise do mecônio | 48 |
| Rendimento de incubação..... | 48 |
| Embriodiagnóstico..... | 48 |
| Alojamento das aves..... | 49 |
| Pesquisa de <i>Salmonella</i> em órgãos..... | 50 |
| Bioquímica sérica e parâmetros hematológicos | 50 |
| Análise Estatística | 51 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| CONCLUSÃO..... | 58 |
| REFERÊNCIAS | 59 |
| CAPÍTULO 4 – EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (<i>Myrciaria cauliflora</i>) COMO ADITIVO ALIMENTAR EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM <i>Salmonella</i> HEIDELBERG | 63 |
| INTRODUÇÃO..... | 65 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 67 |
| Delineamento experimental..... | 67 |
| Preparação do inóculo e inoculação das aves..... | 67 |
| Obtenção do extrato etanólico de cascas e sementes <i>M. cauliflora</i> | 68 |
| Programa alimentar..... | 69 |
| Desempenho | 69 |
| Histomorfometria intestinal..... | 70 |
| Pesquisa de <i>Salmonella</i> em excretas | 71 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Contagem de células calciformes | 71 |
| Análise Estatística | 71 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 73 |
| CONCLUSÕES | 78 |
| REFERÊNCIAS | 79 |
| CAPÍTULO 5 – ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (<i>Myrciaria cauliflora</i>) EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM <i>Salmonella</i> HEIDELBERG | 83 |
| INTRODUÇÃO..... | 85 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 86 |
| Delineamento experimental..... | 86 |
| Preparação do inóculo e inoculação das aves..... | 86 |
| Obtenção do extrato etanólico de cascas e sementes <i>M. cauliflora</i> | 87 |
| Programa alimentar..... | 88 |
| Pesquisa de <i>Salmonella</i> em órgãos..... | 88 |
| Exame biométrico dos órgãos..... | 89 |
| Contagem de linfócitos em órgãos | 89 |
| Contagem de heterófilos e linfócitos no sangue..... | 90 |
| Análise Estatística | 90 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 91 |
| CONCLUSÕES | 95 |
| REFERÊNCIAS | 96 |
| CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS | 99 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Aspectos da floração (Imagem A) e dos frutos maduros (Imagem B) de *Myrciaria cauliflora*. 13

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Diferença na formação dos halos de inibição para *Salmonella* Typhimurium utilizando o método de disco difusão e método de difusão em ágar . Legenda: EJ – extrato de jabuticaba; AE – padrão do ácido elágico; GEN: gentamicina. 35

FIGURA 2 – Resultado do teste de Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora* (EJ) e do padrão do ácido elágico (AE) frente à cepas de *Salmonella enterica* (SE) e *Salmonella* Heidelberg (SH). A coloração vermelha indica o crescimento microbiano. Controle (C)..... 37

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – Aparência dos ovos após a aplicação do extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba. 52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelas técnicas de disco e poço empregando o extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora*, padrão do ácido elágico e gentamicina frente às cepas de *Salmonella enterica*..... 33

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora* e do padrão do ácido elágico frente á diferentes cepas de *Salmonella enterica* 36

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Composição percentual da ração experimental fornecida às aves durante o período experimental (1 - 10 dias de idade) 50

TABELA 2 – Valores médios para os parâmetros de incubação em cada um dos tratamentos experimentais..... 52

TABELA 3 – Frequência de isolamento de *Salmonella* Heidelberg em amostras de embriões e mecônio de pintos recém-eclodidos de cada um dos tratamentos experimentais..... 53

TABELA 4 – Frequência de isolamento de *Salmonella* Heidelberg em amostras de fezes, baço, fígado e saco da gema de pintos aos 10 dias de idade de cada um dos tratamentos experimentais..... 54

TABELA 5 – Valores de ácido úrico (AU), creatinina (CREA), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT) de cada um dos tratamentos experimentais 55

TABELA 6 - Valores de proteínas totais (PROT), albumina (ALB), globulina (GLOB), colesterol total (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicédeos (TRIGL) de cada um dos tratamentos experimentais..... 56

TABELA 7 – Valores de contagem de hemácias (Hm), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de cada um dos tratamentos experimentais..... 57

CAPÍTULO 4

TABELA 1 – Composição percentual das rações experimentais fornecidas às aves durante o período experimental (1 - 28 dias de idade) 69

TABELA 2 – Peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), níveis de significância (*P*) e coeficiente de variação (CV) observados nos tratamentos experimentais para a avaliação dos resultados de desempenho..... 73

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 3 – Frequência de isolamento de <i>Salmonella</i> em amostras de excretas das aves de cada um dos tratamentos experimentais | 74 |
| TABELA 4 – Alturas médias dos vilos (AV), profundidade de criptas (PC) e relação vilo/cripta (V/C) do duodeno e jejuno de frangos aos 11 e 28 dias de idade observados em cada um dos tratamentos experimentais | 76 |
| TABELA 5 – Contagem das células caliciformes intestinais aos 11 e 28 dias de idade registradas em cada um dos tratamentos experimentais | 77 |

CAPÍTULO 5

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 - Composição percentual das rações experimentais fornecidas às aves durante o período experimental (1 - 28 dias de idade) | 88 |
| TABELA 2 – Frequência de isolamento (%) de <i>Salmonella</i> em amostras de fígado, baço e tonsila cecal das aves | 91 |
| TABELA 3 – Médias dos pesos relativos do fígado, baço, bursa e timo aos 11 e 28 dias de idade observados em cada um dos tratamentos experimentais..... | 92 |
| TABELA 4 – Médias da contagem de linfócitos de baço, bursa e tonsila cecal aos 11 e 28 dias de idade observados em cada um dos tratamentos experimentais..... | 93 |
| TABELA 5 – Valores de contagem de heterófilos, linfócitos e relação heterófilo/linfócito (H/L) de cada um dos tratamentos experimentais aos 11 e 28 dias de idade | 94 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------------|------------------------------------------------------|
| AMD | - Antibióticos Melhoradores de Desempenho |
| AMPc | - Adenosina monofosfato cíclico |
| AST | - Aspartato animotransferase |
| ATCC | - <i>American Type Culture Collection</i> |
| BALT | - Tecido linfoide associado ao brônquio |
| CALT | - Tecido linfoide associado à conjuntiva |
| CHCM | - Concentração de hemoglobina corpuscular média |
| CIM | - Concentração inibitória mínima |
| COX | - Cicloxigenase |
| CLSI | - <i>Clinical and Laboratoty Standards Institute</i> |
| CTT | - Cloreto de trifeniltetrazólio |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido |
| DTA | - Doenças transmitidas por alimentos |
| EDTA | - Etilenodiamino tetra-acético |
| GALT | - Tecido linfoide associado ao intestino |
| GGT | - Gama glutamil transferase |
| GMPc | - Guanosina monofosfato cíclico |
| Hb | - Hemoglobina |
| HCM | - Hemoglobina corpuscular média |
| HDL | - <i>High density lipoprotein</i> |
| HE | - Hematoxilina eosina |
| Htc | - Hematócrito |
| IL-1 | - Interleucina 1 |
| IL- 6 | - Interleucina 6 |
| Inos | - óxido nítrico induzível sintetase |
| MALT | - Tecidos linfoides associados à mucosas |
| MH | - Müeller-Hinton |
| NALT | - Tecido linfoide associado à nasofaringe |
| OMS | - Organização Mundial da Saúde |
| PAF | - Fator de agregação plaquetária |
| TGI | - Trato gastrintestinal |
| TNF - α | - Fator de Necrose Tumoral - alfa |
| UFC | - Unidades formadoras de colônias |
| UV | - Ultravioleta |
| VALT | - Tecido linfoide associados aos vasos sanguíneos |
| VCM | - Volume corpuscular médio |

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o uso do extrato etanólico de cascas e sementes de *Myrciaria cauliflora* na incubação de ovos férteis e na alimentação de frangos de corte inoculados com *Salmonella* Heidelberg, observando possíveis efeitos benéficos e/ou protetores do extrato sobre a saúde das aves. Foram conduzidos quatro experimentos no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. No primeiro experimento foi avaliada a atividade antimicrobiana *in vitro* e a concentração inibitória mínima do extrato sobre sorovares de *Salmonella*. No segundo experimento foram utilizados 320 ovos férteis distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso em quatro tratamentos com 10 repetições cada: CN – grupo controle negativo; EJ – grupo que recebeu apenas o extrato na casca; SH – grupo que recebeu apenas o inóculo bacteriano na casca; e SH + EJ – grupo que recebeu o inóculo bacteriano e o extrato na casca. Os ovos incubados não eclodidos ao final da incubação foram submetidos ao embriodiagnóstico e processados para pesquisa de *Salmonella*. Os pintos nascidos foram alojados até os 10 dias de idade, período em que se realizou a coleta de amostras para pesquisa de *Salmonella*, bioquímica sérica e hemograma. No terceiro e quarto experimentos foram utilizados 336 pintos machos de um dia de idade distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso em quatro tratamentos com sete repetições cada: CN – grupo controle negativo; EJ – grupo que recebeu apenas o extrato na ração; SH – grupo que recebeu o inóculo bacteriano via ingluvívio; e SH + EJ – grupo que recebeu o inóculo bacteriano via ingluvívio e o extrato na ração. Foram avaliados o desempenho, excreção fecal e presença de *Salmonella* em órgãos, biometria de órgãos, histomorfometria intestinal, contagem de células calciformes e células imunológicas em órgãos e no sangue. No primeiro experimento, o extrato apresentou fraca ação inibitória sobre *Salmonella enterica*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium. No segundo experimento verificou-se que o extrato promoveu menor eclodibilidade e maior mortalidade embrionária. O isolamento de *Salmonella* foi maior nas amostras de embriões e mecônio do grupo que recebeu o extrato. Aos 10 dias de idade o extrato reduziu o hematócrito, o nível de colesterol sérico e a excreção e colonização dos órgãos. No terceiro experimento verificou-se que a suplementação com o extrato não influenciou o desempenho, aumentou a excreção de *Salmonella* nas aves inoculadas e reduziu o número de linfócitos no sangue das aves. Conclui-se que o uso do extrato etanólico de *M. cauliflora* apresentou fraca atividade antimicrobiana *in vitro* nas cepas de *Salmonella* testadas. Nos ovos embrionados o seu uso não é viável, entretanto quando acrescentado na ração, pode estimular a produção de linfócitos em órgãos linfóides.

Palavras-chave: aditivos, desempenho, histomorfometria, imunidade, salmonelose.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the use of the ethanolic extract of bark and seeds of *Myrciaria cauliflora* in the incubation of fertile eggs and in the feeding of broilers inoculated with *Salmonella* Heidelberg, observing possible beneficial and or protective effects of this phytochemical on health systemic effects of birds. Three experiments were carried out at the Experimental Center for Bird Diseases and Laboratory of Bacteriology of the Department of Veterinary Medicine of the Veterinary and Zootechnical School of the Federal University of Goiás. In the first experiment was evaluated the antimicrobial *in vitro* activity was evaluated and the minimum inhibitory concentration of ethanolic extract of *M. cauliflora* on *Salmonella enterica* different strains. In the second experiment, 320 fertile eggs distributed in randomized design were used in four treatments with 10 replicates each: CN - negative control group; EJ - group that received only the extract in the shell; SH - group that received only the bacterial inoculum in the shell; and SH + EJ - group that received the bacterial inoculum and the extract in the shell. The eggs incubated non-hatched were submitted to embryodiagnosis and processed for *Salmonella* in the embryos. The chicks born were housed until 10 days of age, during which time the collection and processing of samples for *Salmonella* research, serum biochemistry and hemogram were performed. In the third experiment, 336 one - day - old male chicks were distributed in randomized design in four treatments with seven replicates each: CN - negative control group; EJ - group that received only the vegetal extract in the diet; SH - group that received the inoculum bacterial in crop; and SH + EJ - group that received the bacterial inoculum in crop and the extract in the diet. Performance indexes, fecal excretion and presence of *Salmonella* in organs, organ biometry, intestinal histomorphometry, goblet cell counts and immune cells in organs and blood were evaluated. In the first experiment, the extract presented low inhibitory action on the strains of *Salmonella enterica*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium. In the second experiment it was verified that the extract promoted less hatchability and higher embryonic mortality. The *Salmonella* isolation was higher in the embryo and meconium samples of the group that received the extract. At 10 days of age the extract reduced the excretion and colonization of the organs by *Salmonella* and the hematocrit and serum cholesterol level. In the third experiment it was verified that the extract increased the excretion of *Salmonella* in the inoculated birds and reduced the number of lymphocytes in the blood. It is concluded that the use of the ethanolic extract of bark and seeds of *M. cauliflora* presented weak antimicrobial activity *in vitro* for the strains of *Salmonella enterica* tested. In embryonated eggs its use is not feasible, however when added in the diet, it can stimulate the production of lymphocytes in lymphoid organs.

Keywords: additives, histomorphometry, immunity, performance, salmonellosis.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

As enfermidades ocasionadas pelo gênero *Salmonella* e transmitidas por alimentos são consideradas um dos mais graves problemas de saúde pública e os produtos avícolas têm um papel importante como veículos nos casos de salmonelose humana^{1,2}. O aumento da incidência dos casos de salmonelose proveniente do consumo de alimentos contaminados evidencia que, apesar dos avanços tecnológicos, esse problema ocorre mundialmente³.

O controle da salmonelose é um desafio para a saúde pública devido ao surgimento/ressurgimento de sorovares em diversos países. Os animais portadores são fatores epidemiológicos importantes, devido à ausência de sintomas e dificuldade técnica em detectá-los antes ou durante a inspeção sanitária nos abatedouros frigoríficos⁴. Além disso, a presença dessa bactéria pode ocasionar prejuízos financeiros com tratamento, medidas de controle, queda na postura de ovos e pintos de qualidade inferior.

Neste contexto, o emprego dos antibióticos melhoradores de desempenho (AMD) fornece proteção contra enfermidades que acometem as aves através da manipulação da sua microbiota intestinal, permitindo a melhoria do ganho de peso e conversão alimentar^{5,6}. Como são adicionados à ração em dosagens muito inferiores a Concentração Mínima Inibitória (CIM) que é recomendada para o controle dos patógenos⁷, o seu uso prolongado em baixas concentrações pode induzir potencial resistência contra antibióticos na maioria das bactérias^{8,9}.

Devido ao aparecimento de microrganismos resistentes aos antibióticos que são usados no tratamento de infecções humanas e animais, a maior preocupação é que ocorra indução da resistência cruzada entre as bactérias que infectam os animais e as que são patogênicas para os humanos, mesmo que essa suposição não tenha sido satisfatoriamente comprovada em estudos científicos^{6,10}.

Devido essa incerteza, a Comissão Europeia decidiu eliminar progressivamente e proibir o uso dos AMD na alimentação dos animais, em janeiro de 2006. Desde então o maior desafio na avicultura comercial é explorar novas alternativas de suplementos alimentares que impulsionem o potencial produtivo das aves, visando alcançar um melhor desempenho possível¹¹. No Brasil, ainda são permitidos o emprego de alguns AMD em rações para animais monogástricos.

Dentre estas alternativas, os fitogênicos têm ganhado maior interesse recentemente, causando um significativo aumento de publicações desde o ano de 2000¹². Os aditivos

fitogênicos são compostos derivados de plantas que são adicionados à dieta dos animais. O principal efeito da adição destes aditivos à ração envolve impactos positivos que podem causar na saúde animal, estimulando a microbiota benéfica intestinal, diminuindo a produção de amônia, proporcionando maior produção de muco no intestino e melhorando a digestibilidade dos alimentos¹²⁻¹⁵.

Outra possível aplicabilidade dos extratos vegetais seria na proteção de ovos férteis contra a invasão por microrganismos patogênicos e, desse modo, reduzir a quantidade de pintos de um dia doentes, e conseqüentemente, diminuir as fontes de infecção para aves saudáveis. Na literatura ainda não há relatos sobre o emprego destes produtos durante o processo de incubação e seus efeitos sobre a eclodibilidade dos ovos, saúde e produtividade das aves.

Myrciaria cauliflora é uma espécie arbórea, membro da família Myrtaceae, conhecida popularmente como jaboticaba. A espécie está presente em regiões de clima temperado, como a Austrália, noroeste da Índia e América do Sul. A planta sobrevive em vários tipos de solo, e no Brasil pode ser encontrada desde o Pará ao Rio Grande do Sul¹⁶⁻¹⁹. A planta possui conhecidas atividades antimicrobiana^{20,21}, anti-inflamatória²² e hipocolesterolêmica²³, o que faz com que diferentes partes dessa espécie vegetal possam ser potencialmente empregados como aditivos fitogênicos na alimentação dos animais.

Diante do exposto, este trabalho propõe-se a desenvolver um estudo experimental sobre o uso do extrato etanólico de cascas e sementes de *M. cauliflora* na incubação de ovos férteis e na alimentação de frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Heidelberg, observando possíveis efeitos benéficos e/ou protetores deste fitogênico sobre a saúde das aves.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* sp.

As bactérias do gênero *Salmonella* são classificadas como bacilos pequenos (0,7 a 1,5 x 2,5 µm), Gram-negativos aeróbios ou anaeróbios facultativos, incapazes de formar esporos. Pertencem à família Enterobacteriaceae e são móveis por meio de flagelos peritríquios (exceto *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*). Produzem gás a partir da glicose (exceto *Salmonella Typhi*) e utilizam o citrato com única fonte de carbono²⁴. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 37 e 40°C, embora possam se multiplicar em temperaturas entre 5 a 45°C^{25,26}.

O gênero é composto por duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A primeira é subdividida em seis subespécies – *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* – que possuem vários sorovares. A classificação além dos níveis de subespécie é realizada através da tipificação sorológica por meio do sistema de classificação de Kauffmann-White, que baseia-se nas estruturas antigênicas encontradas na superfície da célula microbiana, como por exemplo, o envelope ou cápsula – antígeno capsular “Vi”, a parede celular – antígenos somático “O”, e os flagelos – antígenos flagelares “H”²⁷.

Salmonelose aviária é o termo genérico utilizado para designar a enfermidade causada por qualquer membro do gênero *Salmonella*. Os sorovares que infectam as aves produzem enfermidades distintas, classificados em: pulrose (causada por *Salmonella Pullorum*), tifo aviário (causado por *Salmonella Gallinarum*) e as infecções paratíficas (ocasionada por qualquer outro sorovar). A terceira forma da doença possui maior impacto na saúde pública, já que os sorovares paratíficos podem colonizar o trato gastrointestinal (TGI) e disseminar-se de forma sistêmica, geralmente sem promover sinais clínicos evidentes. Além disso, as salmonelas paratíficas são frequentemente isolados em produtos avícolas, o que representa um risco para as pessoas que consomem esses alimentos^{3,28,29}.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por 180 milhões, ou 9% dos casos dos quadros diarreicos que acontecem mundialmente todo ano. Sugere-se que 52% desses casos sejam provocados por sorovares paratíficos³⁰. Dentre estes, *Salmonella* Heidelberg destaca-se como um dos mais potencialmente patogênicos para seres humanos, nos quais pode causar complicações graves como septicemia, miocardite e morte^{31,32}. Outro aspecto relevante sobre este sorovar é a redução da sua suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração, o que representa uma

grande preocupação já que limita as opções de tratamento para crianças e gestantes que desenvolvem a forma sistêmica da salmonelose³³. Também já foi relatada a resistência de *Salmonella* Heidelberg a ampicilina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, sulfisoxazole e tetraciclina³⁴.

Salmonella Heidelberg é citado como o quarto sorovar mais isolado em carnes comercializadas e rações de animais nos Estados Unidos³⁵, onde acredita-se que promova aproximadamente 84.000 casos anuais de salmonelose³⁶. No Brasil, este sorovar está sendo mais frequentemente isolado em produtos avícolas nos últimos anos. No sul do país, *Salmonella* Heidelberg foi detectado em 40,6% de carcaças de frangos analisadas por Pulido-Landínez et al.³⁷. Nos 1.543 suabes de arrasto coletados em granjas de frangos de corte localizadas nos estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, o sorovar Heidelberg foi o terceiro mais detectado, representando 7,31% do total³⁸.

Nas aves domésticas, principalmente nos animais jovens, *Salmonella* Heidelberg pode ocasionar o aparecimento de sinais clínicos^{39,40}. Em pintos, a enterite causada pelas salmonelas paratíficas pode resultar em danos intestinais que podem afetar o desenvolvimento do órgão e, conseqüentemente, piorar os índices de ganho de peso e conversão alimentar, além de retardar a maturação do sistema imune⁴¹. De acordo com Borsoi et al.⁴², as alterações na mucosa intestinal provocadas por *Salmonella* Heidelberg são comparáveis às provocadas por *Salmonella* Enteritidis.

Além de promover a colonização intestinal, *Salmonella* Heidelberg é capaz de invadir órgãos, como o fígado, onde já foi detectada seis horas após a inoculação experimental. Tal fato demonstra o potencial deste sorovar como causador de doença sistêmica em pintos recém-eclodidos e como contaminante de carcaças e seus subprodutos⁴².

2.2 *Salmonella* sp. na produção de frangos de corte

Dentre todas as espécies animais, a presença de bactérias do gênero *Salmonella* é mais frequentemente relatada em aves e produtos de origem avícola. Assim, a ingestão desse tipo de alimento contaminado e/ou indevidamente preparado está diretamente relacionada com surtos de toxinfecção humana²⁸. Nos Estados Unidos, bactérias do gênero *Salmonella* causam aproximadamente 1,2 milhões de casos anualmente⁴³. Na China, aproximadamente 75% das doenças transmitidas por alimentos (DTA) registrados em um ano foram atribuídas à diferentes sorovares de *Salmonella*⁴⁴. Dados brasileiros recolhidos entre os anos de 2007 a 2017 revelaram que as salmoneloses foram a segunda maior causa de DTA de origem

bacteriana⁴⁵. Embora tenham sido feitos progressos na redução da prevalência e frequência de contaminação por *Salmonella* em produtos avícolas, há uma pressão cada vez maior no mercado internacional para prevenir ou eliminar esse patógeno nas instalações de criação das aves⁴⁶.

Em vista das inúmeras fontes de infecção para as aves e seus subprodutos, é imprescindível que haja um rigoroso controle durante todas as fases de produção. Entretanto, uma grande parte dos procedimentos será ineficaz se a criação for iniciada com aves acometidas pelo patógeno. Portanto, as principais medidas de controle devem ser direcionadas a produção de ovos férteis livres de *Salmonella*²⁸. Além disso, a qualidade microbiológica dos ovos incubáveis é primordial para obtenção de altas taxas de eclodibilidade, visto que as condições ideais para o desenvolvimento do embrião podem ser modificadas pela presença de microrganismos, que irão afetar fatores como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, ocasionando mortalidade de embriões e pintos recém-eclodidos^{47,48}.

Por possuir todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, o ovo representa um meio ideal para a multiplicação microbiana e, por esse motivo, apresenta diversas estruturas que dificultam a invasão e sobrevivência de microrganismos⁴⁹. Essas barreiras são constituídas pela cutícula, casca e membranas da casca⁵⁰.

A cutícula recobre a superfície externa da casca e é composta por proteínas, açúcares, lipídios e ácido siálico. Essa película de cera é formada durante os últimos 30 minutos anteriores a postura e, além de proteger o ovo contra invasão microbiana, evita a evaporação de água. A casca é uma estrutura rígida que forma uma câmara que protege o embrião contra agressões do meio ambiente, penetração de microrganismos e também fornece o cálcio e outros elementos minerais para a formação do pintinho⁴⁷. As membranas são constituídas por três camadas distintas: a membrana interna (mais espessa) e membrana externa (mais fina), que estão separadas apenas na área onde é formada a câmara de ar; e uma terceira camada homogênea formada por material denso, denominada membrana limitante⁵¹. São estruturas semipermeáveis, permitindo a passagem de gases, água e cristaloides⁵² e retendo possíveis microrganismos⁵³.

Além dessas barreiras físicas, o albúmen dispõe de várias substâncias que possuem atividade antibacteriana, como a lisozima, ovotransferrina e inibidores de proteinases que dificultam a sobrevivência microbiana no interior do ovo. A lisozima é uma proteína alcalina abundante no albúmen (cerca de 3,5 g/L) e constitui um importante componente de defesa não específico devido a sua capacidade de controlar o crescimento de bactérias suscetíveis, nas quais atua degradando o peptidoglicano bacteriano⁵⁴.

A ovotransferrina é uma glicoproteína presente na concentração de aproximadamente 13 g/L e atua como quelante de íons multivalentes tais como zinco, ferro, cobre e manganês. A capacidade de quelação do ferro é o principal mecanismo bacteriostático da ovotransferrina, uma vez que ela indisponibiliza a utilização deste metal que é essencial para o metabolismo bacteriano⁵⁵. Os inibidores de proteases são responsáveis por limitar a capacidade proteolítica das bactérias. No albúmen os principais inibidores conhecidos são cistatina, ovomucóide, ovoinibidor e ovostatina⁵⁴.

Mesmo dispondo de inúmeros mecanismos de defesa, alguns sorovares de *Salmonella* desenvolveram a capacidade de superá-los ou sobreviver a eles. Em seu estudo, Andrade et al.⁵⁶ detectaram *Salmonella* Enteritidis em 16,5% das amostras de mecônio de peruzinhos que foram inoculados na casca. Raghianti et al.⁵⁷ verificaram a presença de *Salmonella* Heidelberg no conteúdo interno de ovos após 2:16 – 2:44 horas após a contaminação da casca. Também Andrade et al.⁵⁸ verificaram a positividade 87,5% das amostras do conteúdo cecal de frangos de corte aos um, sete, 14 e 21 dias de idade que foram inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis.

Os ovos podem ser contaminados durante sua formação ou passagem pelo trato reprodutivo da fêmea (ovário ou oviduto), processo denominado transmissão vertical ou transovariana. Já a transmissão horizontal, que é a forma mais comum, pode ocorrer durante ou após a postura, na qual ocorre a penetração do agente que foi depositado na casca através do contato com fezes, ninhos, mãos de manipuladores, cama, água, bandejas e incubadoras^{47,59-62}.

Vários fatores intrínsecos e extrínsecos afetam a capacidade de *Salmonella* em invadir e multiplicar no interior dos ovos. Dentre os fatores intrínsecos, pode-se destacar a presença e integridade da cutícula; características da casca (qualidade, porosidade e presença de defeitos) e propriedade filtrante das membranas. Os fatores extrínsecos incluem a influência da tensão bacteriana e número de microrganismos, temperatura, umidade e condições de armazenamento. Associado a isto, o gênero possui defesas naturais contra as substâncias antimicrobianas presentes no albúmen, como a presença de membrana externa (evita a entrada de moléculas maiores que 650 Da)⁶³, síntese de inibidores de lisozima, utilização de reservas intracelulares de ferro e/ou produção de quelantes férricos extracelulares (sideróforos)⁶⁴.

Quando os ovos contaminados são incubados, a propagação de *Salmonella* é favorecida. Fragmentos de casca e membranas, os próprios pintinhos, suas penas e mecônio tem grande potencial infectante. A partir desse material, a bactéria se dissemina pelo ar para

outros setores do incubatório²⁸. A presença de *Salmonella* em ovos férteis também constitui uma relevante fonte de infecção para aves em crescimento, carcaças processadas e, eventualmente, o ser humano⁶⁵. Este fato foi comprovado por Byrd et al.⁶⁶ que verificaram relação entre os sorovares encontrados no incubatório e nas carcaças.

Os pintos infectados encaminhados às granjas aumentam as possibilidades de transmissão horizontal para outras aves através de ingestão de água de bebida e ração contaminada (forma mais comum), aerossóis, contato com fômites (bebedouros, comedouros, aquecedores), ou ainda pela conjuntiva ocular²⁸.

2.3 Resposta imunológica das aves contra *Salmonella* sp.

As aves não possuem linfonodos, e sim, tecidos linfoides associados à mucosa (MALT), cujos principais representantes são: o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), tecido linfoide associado ao brônquio (BALT), tecido linfoide associado à nasofaringe (NALT), tecido linfoide associado à pele (SALT), tecido linfoide associado aos vasos sanguíneos (VALT), tecido linfoide associado à conjuntiva (CALT). O GALT é responsável pela defesa do intestino contra patógenos bacterianos, virais e parasitários, sendo constituído pelas tonsilas cecais, placas de Peyer, divertículo de Meckel, linfócitos intraepiteliais intestinais e células imunes residentes^{67,68}.

A resposta imunológica das aves, assim como nas demais espécies, pode ser dividida em dois tipos: inata e adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra patógenos, induzindo a formação de uma resposta inflamatória inespecífica. Já a imunidade adaptativa ocorre após a inata e promove uma série de eventos que culminam na eliminação do agente patogênico e na formação de uma memória imunológica⁶⁹.

Quando a porta de entrada é pela ingestão oral, o microrganismo pode alcançar a superfície da mucosa intestinal e lâmina própria, onde localizam-se os enterócitos e células M (células sem microvilosidades) aos quais *Salmonella* tem a capacidade de promover dano citotóxico⁶⁶. As bactérias invadem as células e são internalizadas em um vacúolo que se direciona rumo à lâmina própria. Esta invasão promove intensa reação inflamatória que atraem polimorfonucleares, promovendo morte celular e comprometimento dos folículos associados ao epitélio⁶⁸. Estudos demonstraram a presença de *Salmonella* Enteritidis na lâmina própria da parede cecal apenas 12 horas após a inoculação via oral⁷⁰.

As lesões intestinais promovidas por sorovares paratífoides pode afetar diretamente a quantidade de nutrientes digeridos e absorvidos⁷¹. A inoculação com *Salmonella* Sofia prejudicou o desempenho e o consumo de ração das aves, conforme

observado por Olnood et al.⁷² Também Ashayerizadeh et al.⁷³ verificaram menor ganho de peso e pior conversão alimentar em frangos inoculados com *Salmonella* Typhimurium.

Após a invasão da lâmina própria, inicialmente ocorre uma resposta inflamatória não específica, o que reduz a quantidade de bactérias que alcançam a corrente sanguínea. Nesta fase, os macrófagos são as células efetoras primárias⁷⁰. Diferentemente de outros microrganismos, *Salmonella* sp. é resistente às substâncias antimicrobianas produzidas por macrófagos e, assim que estas células retornam ao leito vascular, disseminam o agente para outros órgãos, promovendo um quadro sistêmico⁶⁷. Segundo Van Immerseel et al.⁷⁰, *Salmonella* Enteritidis pode ser detectada em grande quantidade em fígado e baço após três dias da inoculação via oral.

A atração e ativação de linfócitos T para a lâmina própria reduzirão a invasão bacteriana e contribuirão para o desenvolvimento de uma resposta imune específica contra *Salmonella*. Em seis dias, a resposta imune inata é capaz de reduzir para níveis indetectáveis a quantidade do patógeno, entretanto, *Salmonella* ainda pode persistir no conteúdo cecal⁷⁰. Desse modo, apenas a resposta imune inata não é capaz de eliminar o agente, tornando necessário o estabelecimento de imunidade do tipo adaptativa ou adquirida⁷⁴. Nesse tipo de resposta, as imunoglobulinas de alta especificidade presente no soro do hospedeiro, principalmente os das classes IgA, IgM e IgG, podem bloquear a colonização, opsonizar e eliminar o microrganismo, além de neutralizar suas toxinas^{70,75-79}. Consequentemente a lise das bactérias opsonizadas, promove a intensificação da resposta inflamatória e o recrutamento e ativação de mais leucócitos^{80,81}.

Outro aspecto relevante da resposta imunológica às salmoneloses é a indução do estado de carreador que consiste em um mecanismo de persistência cecal da bactéria, que acomete principalmente as aves que se infectam ainda jovens⁸². Um dos fatores que contribuem para o estado de carreador é o nível de maturidade do GALT, que somente se completa aos 21 dias de idade⁸³.

2.4 Aditivos fitogênicos e suas propriedades biológicas

Nos últimos anos, os produtos contendo óleos e extratos vegetais, ervas e especiarias estão sendo empregados como aditivos alimentares com o objetivo de melhorar a produtividade animal. Esses aditivos fitogênicos apresentam vários efeitos biológicos, incluindo a melhoria da digestibilidade e sabor da ração, estímulo da secreção das enzimas digestivas, aumento da motilidade gástrica e intestinal, além das atividades antimicrobiana, anti-helmíntica, coccidiostática, anti-viral, anti-inflamatória, anti-oxidante e pigmentante de

carne e ovos⁸⁴. Essas propriedades farmacológicas são promovidas pelos metabólitos secundários, também denominados fitoquímicos^{85,86}. Estes compostos são produzidos pelo metabolismo vegetal e desempenham papel fundamental na interação planta-ambiente, protegendo-a contra o ataque de microrganismos, pragas e animais herbívoros^{87,88}.

A concentração dos fitoquímicos nos tecidos vegetais podem variar de acordo com a espécie, parte da planta (folhas, frutos, caule ou raízes) ou ainda pela sazonalidade, ritmo circadiano, idade e estágio de desenvolvimento vegetal, temperatura, disponibilidade de água, nutrientes presentes no solo, radiação ultravioleta, poluição atmosférica, altitude e presença de pragas⁸⁹. Os metabólitos secundários com atividades biológicas são principalmente os terpenoides, (monoterpenos e sesquiterpenos, esteroides), fenólicos (taninos), glicosídeos e alcaloides (presentes como alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, lactonas e outros)⁶.

A atividade antimicrobiana é provavelmente a propriedade dos fitogênicos que exerce maior impacto sobre a saúde e bem-estar das aves^{90,91}. O efeito dos fitogênicos sobre os microrganismos é determinado por suas características físico-químicas, como pH, solubilidade, pKa, polaridade, que promovem ação bactericida e bacteriostática dose dependente sobre vírus, bactérias, fungos e protozoários^{92,93}.

A baixa incidência de doenças infecciosas em plantas selvagens é uma indicação da eficácia dos fitoquímicos presentes em seus tecidos⁹⁴. Um importante mecanismo de ação de certos extratos vegetais está relacionado à sua capacidade de influenciar as características da superfície da célula bacteriana, como a hidrofobicidade, e conseqüentemente, alterar suas propriedades de virulência. Isto tem implicações na saúde intestinal dos animais, já que a adesão dos patógenos às células hospedeiras é fortemente influenciada pela hidrofobicidade da superfície da célula microbiana. Outras possíveis contribuições dos produtos fitogênicos no controle de patógenos são a estimulação na produção de muco intestinal – que diminui a aderência destas bactérias à mucosa do intestino, além da redução na síntese de toxinas bacterianas⁹⁵⁻⁹⁷.

Algumas pesquisas avaliaram os efeitos da suplementação com fitogênicos sobre a diversidade da microbiota intestinal de frangos e relataram resultados positivos. Kirkipinar et al.⁸⁴ demonstraram que a inclusão dos óleos essenciais de orégano e alho, combinados ou isolados, diminuiu a população de clostrídios no intestino das aves. Também Li et al.⁹⁸ verificaram a redução da excreção de *E. coli* em frangos alimentados com extrato de pinheiro coreano. Wati et al.⁹⁹ observaram que a administração de uma mistura de extrato de erva-

doce, melissa, pimenta, anis, cravo e tomilho reduziram o contagem de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo cecal de frangos experimentalmente inoculados.

Além das propriedades antimicrobianas, os vegetais e seus compostos bioativos também podem modular a função imune dos animais. Na literatura estão descritos efeitos anti-inflamatórios, melhoria na imunidade humoral e celular, receptores específicos, enzimas e moléculas imunológicas¹⁰⁰.

Os fitoquímicos naturais podem interferir direta ou indiretamente em moléculas e mecanismos relacionados ao processo inflamatório como: produção e ação de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, aminas vasoativas, peptídeos, fator de agregação plaquetária – PAF) e mensageiros secundários (guanosina monofosfato cíclica – GMPc, adenosina monofosfato cíclica – AMPc, proteínas cinases, cálcio), expressão de moléculas pró-inflamatórias, como a óxido nítrico induzível sintetase (iNOS), ciclooxigenase (COX), neuropeptídeos e proteases⁹². Compostos como polifenóis, saponinas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides, triterpenos e alcaloides são os responsáveis pela ação anti-inflamatória demonstrada pelas plantas⁹³.

Os efeitos imunomoduladores dos fitogênicos já foram reportados por Gandomani et al.¹⁰¹, que verificaram o aumento a titulação de anticorpos contra hemácias de ovelhas e contra o vírus da Doença de Newcastle em aves suplementadas com cravo-da-índia em pó. Também Landy et al.¹⁰² observaram incremento da resposta imune humoral de frangos alimentados com o pó da fruta de neem. Mesmo já sido relatada a atividade imunomodulatória dos compostos vegetais, seu emprego na medicina veterinária para este fim ainda é restrito, devido ao desconhecimento dos mecanismos de ação específicos e possíveis efeitos adversos promovidos por estes produtos¹⁰³.

Os metabólitos secundários presentes em frutas nativas brasileiras também podem atuar sobre o perfil lipídico de modelos animais. Oliveira e Genovese¹⁰⁴ demonstraram que o extrato de cacau e cupuaçu foi capaz de reduzir os triglicerídeos plasmáticos em ratos diabéticos. Alezandro et al.¹⁰⁵ observaram a redução em 32% dos níveis séricos de colesterol total de cobaias alimentadas com os frutos de jabuticaba em pó. e Gonçalves et al.¹⁰⁶ relataram aumento do nível de lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoproteins* – HDL) nas cobaias diabéticas alimentadas com camu-camu. Os efeitos sobre a dislipidemia observados são relacionados com a grande quantidade de polifenóis presentes nestas espécies, como catequina e a proantocianidinas, que são capazes de inibir a atividade da lipase pancreática, enzima responsável pela degradação lipídica no intestino, o que acarreta uma menor absorção destas moléculas^{107,108}.

Em frangos de corte, os estudos sobre efeitos hipocolesterolêmicos promovidos pelos aditivos fitogênicos também apontam resultados benéficos. Hong et al.¹⁰⁹ relataram menores níveis séricos de colesterol total em frangos alimentados com uma mistura de óleos essenciais de orégano, anis e cascas cítricas. Também Cho et al.¹⁵ verificaram redução do nível de colesterol total sérico em frangos de corte suplementados com óleos essenciais de timol e anis. Entretanto, Calislar et al.¹¹⁰ não observou qualquer efeito do extrato de orégano sobre colesterol ou triglicerídeos das aves. De acordo com Lee et al.¹¹¹ os óleos essenciais possuem maior propriedade hipocolesterolêmica que os extratos vegetais, o que explicaria a diversidade de resultados com a mesma espécie de planta.

As alterações nos valores hematológicos geralmente refletem mudanças no estado fisiológico e, portanto, são parâmetros utilizados para mensurar os efeitos da terapêutica, nutrição e ambiência na medicina humana e veterinária¹¹². Os aditivos fitogênicos podem estimular órgãos relacionados com a hematopoiese, como baço e medula óssea¹¹³. Sugere-se que alguns compostos bioativos possuem maior afinidade com a hemoglobina, promovendo um leve grau de hipóxia, o que levaria à uma maior produção de hemácias. Também é possível que ocorra estímulo da secreção de eritropoietina pelos rins, acarretando maior síntese celular pela medula óssea¹¹².

Os efeitos supracitados foram comprovados por Toghyani et al.¹¹², que observaram maiores concentração de hemoglobina e o hematócrito nas aves alimentadas com alho em pó. Também Park et al.¹¹⁴ demonstraram que a suplementação com os extratos de *Saposhnikovia divaricata*, *Lonicera japonica* e *Chelidonium majus* aumentaram a quantidade de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos no sangue de frangos de corte.

Os fitogênicos também são conhecidos por alterarem as propriedades organolépticas da ração, o que é uma característica de pouca importância para a alimentação das aves, visto que a espécie possui limitada quantidade de papilas gustativas¹¹¹. A melhoria dos índices zootécnicos relacionados à inclusão desses aditivos à dieta dos animais está relacionada ao estímulo da atividade enzimática digestiva, que conseqüentemente melhora a digestibilidade dos nutrientes^{115,116}. Outro efeito dos fitogênicos está associado à redução da oxidação dos ácidos graxos nos enterócitos que, por sua vez, melhoram a integridade intestinal e o dano oxidativo hepático¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Muitos estudos foram realizados com objetivo de determinar os efeitos dos fitogênicos dietéticos e suas combinações sobre o desempenho de frangos de corte. Wati et al.⁹⁹, que relataram que a inclusão da mistura de extratos de erva-doce, melissa, pimenta, anis, cravo e tomilho melhorou o índice de conversão alimentar e ganho de peso. Também Li et

al.¹¹³ verificaram melhor conversão alimentar e maior consumo de ração em frangos suplementados com extrato de pinheiro coreano até os 35 dias de idade. Paraskeuas et al.¹²⁰ observaram que a inclusão de uma mistura de óleos essenciais de menta, anis e cravo na dieta das aves aumentou, de maneira linear, o ganho de peso, conversão alimentar e digestibilidade da matéria-seca.

Entretanto, Akbarian et al.¹²¹ não observaram melhoria no desempenho de frangos suplementados com extratos da casca de laranja e limão. Também Kickzorowska et al.¹²² não detectaram influência da adição da resina de *Boswellia serrata* nos índices zootécnicos das aves. Já no estudo de Kirkipinar et al.⁸⁴, a utilização do óleo essencial de orégano reduziu o peso corporal de frangos de corte. A variedade de resultados verificados na utilização dos fitogênicos como melhoradores de desempenho em frangos de corte expressam a necessidade de estudos mais detalhados sobre os níveis de inclusão destes produtos.

2.5 *Myrciaria cauliflora*

Popularmente conhecida como “jabuticaba-paulista” ou “jabuticaba-açu”, *Myrciaria cauliflora* é uma frutífera nativa e muito cultivada principalmente na região Sudeste. A espécie é semidecídua, de 3 – 6 metros de altura, com casca lisa de coloração pardo-clara e manchada. A sua madeira é bastante resistente, as folhas são opostas e lanceoladas. As flores são brancas e sésseis e ficam aglomeradas sobre caule e ramos (Figura 1). Os frutos são do tipo baga globosa com casca de coloração preta-arroxeadada ou verde-bronzeadas que podem possuir ou não listras roxas ou vermelhas (Figura 1). A polpa é branca e macia, suculenta e com sabor agridoce, podendo apresentar de uma a quatro sementes^{17,123}.

Os frutos são bastante apreciados *in natura* e também são empregados para fabricação de geleias, sucos, licores, destilados, fermentados, vinagre, sucos e sorvetes¹²⁴⁻¹²⁶. Durante o processo de industrialização, as cascas e sementes são descartadas, o que representa 50% do fruto. Considerando a grande diversidade de substâncias úteis presentes neste resíduo, o seu melhor aproveitamento agregaria valor comercial e evitaria problemas ambientais relacionados ao seu descarte indevido^{127,128}.

As cascas são ricas em compostos fenólicos, fibras alimentares e vitamina C. Os fenóis em maior quantidade na planta são as antocianinas, que pertencem ao grupo dos flavonoides e são responsáveis pela coloração característica do fruto. Essas substâncias podem atuar como antioxidantes endógenos, reduzindo o estresse oxidativo celular através do combate aos radicais livres¹²⁹. Também há relatos que as antocianinas também podem prevenir o diabetes tipo 2 e a obesidade¹²⁶.

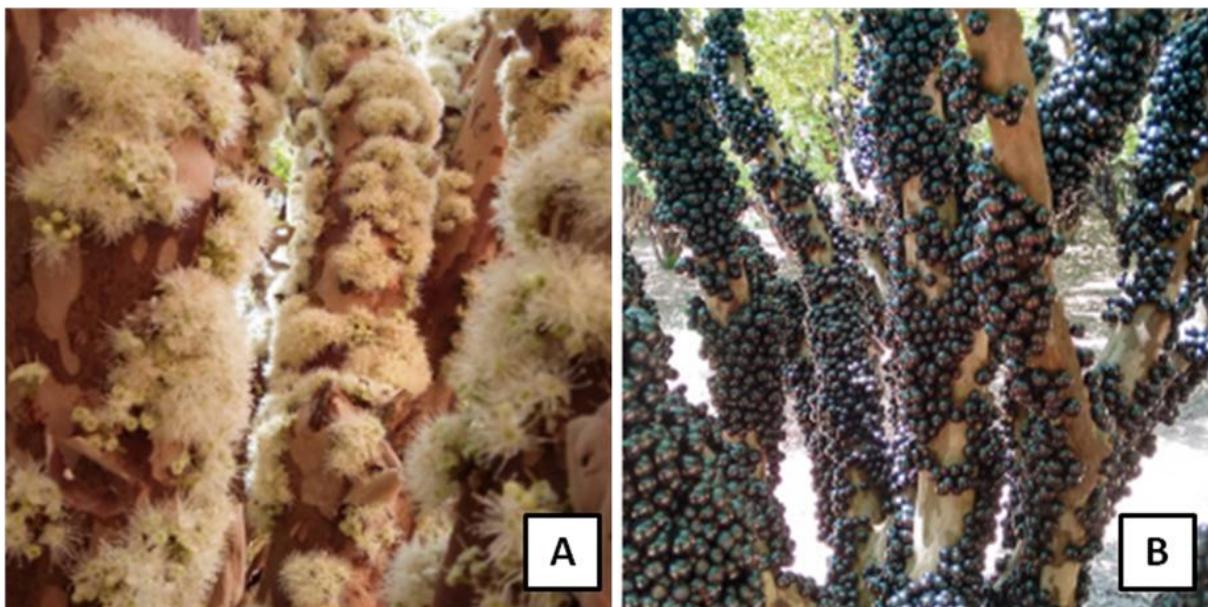


FIGURA 1 – Aspectos da floração (Imagem A) e dos frutos maduros (Imagem B) de *Myrciaria cauliflora*.

Fonte: <http://www.vinicolajabuticabal.com.br>

Além das antocianinas, outros compostos fenólicos como taninos, flavonoides e ácidos fenólicos foram detectados na jabuticaba. No extrato metanólico foi relatada a presença de cianidina, jaboticabina, quercetina, isoquercetina e ácido elágico. Já no extrato aquoso, foram identificados ácidos orgânicos como ácido oxálico, cítrico, tartárico, málico, fumárico, dentre outros¹³⁰.

Nas cascas também foram isolados o sitosterol e o sitosterol-D-glicopiranosídeo, que são fitoesteróis possivelmente responsáveis pela sua atividade hipolipidemiante, reduzindo os níveis de colesterol total e HDL séricos²⁴. Estudos fitoquímicos da jabuticabeira detectaram níveis consideráveis de taninos, que são compostos fenólicos que possuem a habilidade de precipitar proteínas, atuando como agentes antibacteriano e antifúngico. Os taninos também podem inibir a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, exercendo potente ação anti-inflamatória^{23,130}.

Apesar de todas essas propriedades biológicas anteriormente descritas e do potencial existente nos resíduos do processamento da jabuticaba, ainda são escassos os estudos que investigam seu emprego na produção e sanidade animal.

REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. 2002.
2. Cardoso TG, Carvalho VM. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. J Heath Sci Inst. 2006; 24(2):95-101.
3. Cardoso ALSP, Tessari ENC. *Salmonella* na segurança de alimentos. Arquivo do Instituto Biológico, 2008;70(1):11-3.
4. Tessari ENC, Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Luciano RL, De Castro AGM, Cardoso ALSP. Important aspects of *Salmonella* in the poultry industry and public health. In: *Salmonella – A dangerous foodborne pathogens*. Ed. Barakat S. M. Mahmoud, 2012.
5. Costa PM, Oliveira M, Ramos B, Bernardo F. The impact of antimicrobial use in broiler chickens on growth performance and the occurrence of antimicrobial resistant *Escherichia coli*. Livest Sci. 2011;136:262-9.
6. Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. Vet J. 2011;187(2):182-8.
7. Niewold TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. Poult Sci. 2007;86(4):605-9.
8. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(7):2054-9.
9. Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. Curr opin Microbiol. 2001;4(5):493-9.
10. Araújo JC, Silva JHV, Amâncio ALL, De Lima MR, Lima CB. Uso de aditivos na alimentação de aves. Acta Veterinária Brasília. 2007;1(3):69-77.
11. Adil S, Banday T, Bhat GA, Mir MS, Rehman M. Effect of Dietary Supplementation of Organic Acids on Performance, Intestinal Histomorphology, and Serum Biochemistry of Broiler Chicken. Veterinary Medicine International. 2010; 2010.
12. Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroiasmayr A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. J Anim Sci. 2007; 86(14) Suppl, p. E140-8.
13. Hashemi SR, Davoodi H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. Vet Res Commun. 2011;35(2):169–80.
14. Abdel-Wareth AAA, KehrausS, Hippenstiel F, Südekum KH. Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers. Anim Feed Sci Technol.2012;178:198–202.

15. Cho JH, Kim HJ, Kim IH. Effects of phytochemicals feed additive on growth performance, digestibility, blood metabolites, intestinal microbiota, meat color and relative weight organs after oral challenge with *Clostridium perfringens* in broilers. *Livest Sci.* 2014;160:82-8.
16. Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3ª Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2007.
17. Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Myrtales medicinais. In: Stasi LC, Hiruma-Lima CA, editores. *Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2ª Ed. São Paulo: Editora UNESP; 2002. p. 321-30.
18. Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17:114-40.
19. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:472-508.
20. De Souza TM. Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg (*Myrtaceae*) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Leguminosae-Mimosoidae*) [tese]. Araraquara – SP: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2007.
21. Hacke ACM, Granato D, Maciel LG, Los Weinert P, Do Prado-Silva L, Alvarenga VO, Sant’Ana AS, Bataglion GA, Eberlin MN, Rosso ND. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds: chemical characterization and extraction of antioxidant and antimicrobial compounds. *J Food Sci.* 2016;81(9):C2206-17.
22. Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chem.* 2008;109(4):883-90.
23. Araújo CRR. Composição química, potencial antioxidante e hipolipidêmico de farinha de cascas de *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba). [Dissertação]. Diamantina – MG Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri: Faculdade de Ciências exatas; 2011.
24. Franco BDGM, Landgraf M. In: Franco BDGM, Landgraf M, editores. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
25. Andreatti Filho RL, De Oliveira GH. Salmoneloses aviárias. In: Andreatti Filho RL, editor. *Saúde aviária e doenças*. São Paulo: Ed. Roca; 2006. p. 84-111.
26. Berchieri Júnior A, Freitas Neto OC. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior A, Silva EM, Di Fábio J, Sesti L, Zuanaze MAF, editores. *Doenças das aves*. 2ª edição. Campinas: Ed. FACTA; 2009. p.435-54.

27. Ferreira EO, Campos LC. *Salmonella*. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. Microbiologia. 5ª edição. São Paulo: Ed. Atheneu; 2008.
28. Andreatti Filho RL. Paratifo aviário. In: Revolledo L, Ferreira AJP, editores. Patologia Aviária. Barueri: Ed. Manole; 2007. p.18-33.
29. Gast RK. *Salmonella* infections. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, editores. Diseases of poultry. 13ª edição. Ames Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. cap. 16, p.677- 736.
30. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015. 2016.
31. Burt CR, Proudfoot JC, Roberts M, Horowitz RH. Fatal myocarditis secondary to *Salmonella* septicaemia in a young adult. J Emerg Med. 1990;8:295–7.
32. Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ. Invasive *Salmonella* infections in the United States, Food- Net, 1996–1999: incidence, serotype distribution, and outcome. Clin Infect Dis. 2004;38:S149–56.
33. PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA – PHAC. *Salmonella* Heidelberg – Ceftiofur-related resistance in human and retail chicken isolates. 2006.
34. Zhao S, McDermott PF, Friedman S, Abbott J, Ayers S, Glenn A, Hall-Robinson E, Hubert SK, Harbottle H, Walker RD, Chiller TM, White DG. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. Foodborne Pathog Dis. 2006;3:106–17.
35. Nisar M, Kassem II, Rajashekara G, Goyal SM, Lauer D, Voss S, Nagajara KV. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern United States. J Vet Diagn Invest. 2017;29(3):370-5.
36. Hennessy TW, Cheng LH, Kassenborg H, Ahuja SD, Mohle-Boetani J, Marcus R, Shiferaw B, Angulo FJ. Egg consumption is the principal risk factor for sporadic *Salmonella* serotype Heidelberg infections: a case-control study in FoodNet sites. Clin Infect Dis. 2004;38(Suppl 3):S237–43.
37. Pulido-Lanínez M, Sánchez-Ingunza R, Guard J, Pinheiro do Nascimento V. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brasil. Lett Appl Microbiol. 2013;57:288-94.
38. Voss-Rech D, Vaz CLS, Alves L, Coldebella A, Leão JA, Rodrigues DP, Back A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broilers farms in Brazil. Poult Sci. 2015;94:433-41.

39. Chittick P, Sulka A, Tauxe RV, Fry AM. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. *J Food Prot.* 2006;69:1150–3.
40. Clothier KA, Byrne BA. Phenotypic and genotypic characterization of animal-source *Salmonella* Heidelberg isolates. *J Vet Med.* 2016;2016:6380890.
41. Ito NMK, Miyaji CI, Okabayashi SM. Saúde intestinal em frangos de corte. Circular Técnica, Avigen do Brasil. Nov. 2007.
42. Borsoi A, Santin E, Santos LR, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poult Sci.* 2009;88:750-8.
43. Boore AL, Hoekstra RM, Iwamoto M, Fields PI, Bishop RD, Swerdlow DL. *Salmonella* enterica infections in the United States and assessment of coefficients of variation: a novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996-2011. *PLoS One.* 2015;10(12): e0145416
44. Wang Y, Cao C, Alali WQ, Cui S, Li F, Zhu J, Wang X, Meng J, Yang B. Distribution and antimicrobial susceptibility of foodborne *Salmonella* serovars in eight provinces in China from 2007 to 2012 (Except 2009). *Foodborne Pathog Dis.* 2017;14:393–9.
45. Secretaria de Vigilância à Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2016.
46. Foley SL, Nayak R, Hanning IB, Johnson TJ, Han J, Ricke SC. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(13):4273-9.
47. Gonzales E. Qualidade interna e externa do ovo: fatores que afetam os resultados da incubação de linhagens pesadas e leves de aves de produção comercial. In: Macari M, Gonzales E, Patrício IS, Nääs IA, Martins PC, editores. Manejo da Incubação. Campinas: Ed. FACTA; 2013. p.143-59.
48. Cony HC, Vieira SL, Berres J, Gomes HA, Coneglian JLB, Freitas DM. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. *Ciênc Rural.* 2008;38(5):1407-12.
49. Sesti L, Ito NMK. Fisiopatologia do sistema reprodutor. In: Berchieri Júnior A, Silva EM, Di Fábio J, Sesti L, Zuanaze MAF, editores. Doenças das aves, 2ª edição. Campinas: Ed. FACTA; 2009.
50. Haigh T, Betts WB. Microbial barrier properties of hen egg shells. *Microbios.* 1991;68:137-46.
51. Bruce J, Drysdale EM. (1994b) Trans-shell transmission. In: Board RG, Fuller R, editors. *Microbiology of the Avian Egg.* London: Ed. Chapman & Hall; 1994. p. 63-91.

52. Ito NM, Miyaji CI, Miyaji SO. Sistema reprodutor e formação do ovo. In: Macari M, Gonzales E, Patrício IS, Nääs IA, Martins PC, editores. Manejo da Incubação. Campinas: Ed. FACTA; 2013. p.1-28.
53. Ruiz J, Lunam CA. Ultrastructural analysis of the eggshell: contribution of the individual calcified layers and the cuticle to hatchability and egg viability in broiler breeders. *Br Poult Sci.* 2002;41:584-92.
54. Baron F, Nau F, Guérin-Dubiard C, Bonnassie S, Gautier M, Andrews SC, Jan S. Egg white versus *Salmonella* Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiol.* 2016;53:82-93.
55. Ibrahim HR, Hoq MI, Aoki T. 2007. Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *Int J Biol Macromol.* 2007; 41:631-40.
56. Andrade CYT, Andrade MA, Café MB, Stringhini JH, Alcântara JB, Sá Jayme V. Efeitos da inoculação de *Salmonella* Enteritidis na incubação de ovos embrionados de perus. *Ci Anim Bras.* 2011;12(2):330-8.
57. Raghianti F, Rocha TS, Rossi DA, Silva PL. Penetration time of *Salmonella* Heidelberg through shells of white and brown commercial eggs. *Braz J Poult Sci.* 2010;12(4):273-7.
58. Andrade MA, Stringhini JH, Minafra-Rezende CS, Andrade L, Sá Jayme V. Histomorphometrical evaluation of gastrointestinal tract and performance of Ross broilers hatched from eggs inoculated with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Ital J Anim Sci.* 2013;12(e65):404-9.
59. Cox NA, Berrange ME, Cason JA. *Salmonella* penetration of eggs shells and proliferation in broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 2000;79(11):1571-4.
60. Humphrey TJ. Contamination of eggshell and contents with *Salmonella* enteritidis: a review. *Int J Food Microbiol.* 1994;21(1):31 - 40.
61. Miyamoto T, Baba E, Takana T, Sasai K, Fukata T, Arakawa A. *Salmonella* enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. *Avian Dis.* 1997;41(1):296-303.
62. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(4):718-38.
63. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(593e):656.
64. Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem.* 1995;270:26723e26726.

65. Pradhan AK, Li Y, Swem BL, Mauromoustakos A. Predictive model for the survival, death, and growth of *Salmonella* Typhimurium in broiler hatchery. *Poult Sci.* 2005;84:1959-66.
66. Byrd JA, Deloach JR, Corrier DE, Nisbet DJ, Stanker LH. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. *Avian Dis.* 1999;43(1):39-47.
67. Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect Dis.* 2005;133(6):959-78.
68. Hirsh DC, Zee YC. *Microbiologia Veterinária*. 1ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.
69. Erf GF. Cell-mediated immunity in poultry. *Poult Sci.* 2004;83(4):580-90.
70. Van Immerseel F, De Buck J, De Smet I, Mast J, Haesebrouck F, Ducatelle R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with *Salmonella* Enteritidis strain. *Dev Comp Immunol.* 2002;26:355-64.
71. Borsoi A. Inoculação de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis em pintos de corte para avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de *Salmonella* Enteritidis. [Tese]. Porto Alegre – RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária; 2009.
72. Olnood CG, Beski SSM, Choct M, Iji PA. Use of *Lactobacillus johnsonii* in broilers challenged with *Salmonella* sofia. *Anim Nutr.* 2015;1:203-12.
73. Ashauerizadeh A, Dastar B, Shargh MS, Mahoonak AS, Zerehdaran S. Fermented rapeseed meal is effective in controlling *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection and improving growth performance in broiler chicks. *Vet Microbiol.* 2017;201:93-102.
74. Penha Filho RAC. Resposta imune celular e humoral em aves (*Gallus gallus*) vacinadas, antes e após o desafio com *Salmonella* Enteritidis. [Tese]. Jaboticabal – SP: Universidade Federal Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2013.
75. Rana N, Kulshreshtha RC. Cell-mediated and humoral immune responses to a virulent plasmid-cured mutant strain of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum in broiler chickens. *Vet Microbiol.* 2006;115(1-3):156-62.
76. Dougan G, John V, Palmer S, Mastroeni P. Immunity to salmonellosis. *Immunol Rev.* 2011;240(1):196-210.
77. Mittrücker HW, Raupach B, Köhler A, Kaufmann SH. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella* Typhimurium infection. *J Immunol.* 2000;164(4):1648-52.

78. Mastroeni P. Immunity to systemic *Salmonella* infections. *Curr Mol Med*. 2002;2(4):393-406.
79. Desmidt M, Ducatelle R, Mast J, Goddeeris BM, Kaspers B, Haesebrouck f. Role of humoral immune system in *Salmonella* enteritidis phage type four infection in chickens. *Vet Immunopathol*. 1998;63:355-67.
80. Ayres JS, Vance RE. Cellular teamwork in antibacterial innate immunity. *Nat Immunol*. 2012;13(2):115-7.
81. Kaiser P, Diard M, Stecher B, Hardt WD. The streptomycin mouse model for *Salmonella* diarrhea: functional analysis of the microbiota, the pathogen's virulence factors, and the host's mucosal immune response. *Immunol Rev*. 2012;245(1,):56-83.
82. Van Immerseel F, De Buck J, Boyen F, Bohez L, Pasmans F, Volf J, Sevcik M, Rychlik I, Haesebrouck F, Ducatelle R. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *App Env Microbiol*. 2004:3582-87.
83. Sadeyen JR, Trotureau J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barrow PA, Bumstead N, Lalmanach AC. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microb Infect*. 2004:1278-86.
84. Kirkpinar F, Bora Unlu H, Ozdemir G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livest Sci*. 2011;137:219-25.
85. Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência*. 2006;(7).
86. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazso P, Ríos JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci*. 2002;(70):1023-33.
87. Bennet RN, Wallsgrove RM. Secondary metabolites in plant defence mechanism. *New Phytol*. 1994;(127):617-33.
88. Govea DR. Estudo da variação populacional dos metabolitos secundários do arnicão (*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernoniaeae, Asteraceae) [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.
89. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova*. 2007; 30(2): 374-381.
90. Yang Y, Iji PA, Choct M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World Poult Sci J*. 2009;65:97-114.
91. Fallah R, Kiani A, Azarfar A. A review of the role of five kinds of alternatives to infeed antibiotics in broiler production. *J Vet Med Anim Health*. 2013;5:317-21.

92. Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor kB (NF- kB). *Planta Med.* 2003;69:973-83.
93. Kumar A, Ilavarasan R, Jayachandran T, Decaraman M, Aravindhyan P. Phytochemicals Investigation on a Tropical Plant, *Syzygium cumini* from Kattuppalayam, Erode District, Tamil Nadu, South India. *Pak J Nutr.* 2009;8(1):835.
94. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotic against infectious diseases. *J Phytomed.* 2008;15:639-52.
95. Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LBG. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2005;42(6):465-70.
96. Kamel C. Natural plant extracts: Classical remedies bring modern animal production solutions. *Cahiers Options Méditerranéennes*; 2001; 54: 31-8.
97. Ahmad A, Viljoen AM, Chenia HY. The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing. *Lett Appl Microbiol.* 2014;60:8–19.
98. Li HL, Zhao PY, Lei Y, Hossain MM, Kim IH. Phytocides, phytochemicals as an alternative to conventional antibiotics, improved growth performance and decreased excreta gas emission without adverse effect on meat quality in broiler chicken. *Livest Sci.* 2015;181:1-6.
99. Wati T, Ghosh T, Syed B, Haldar S. Comparative efficacy of phytochemicals as an alternative to antibiotic growth promoter on production performance, caecal microbial population and humoral immune response of broiler chickens inoculated with enteric pathogens. *Anim Nutr.* 2015;15:213-9.
100. Farooq F, Rai M, Tiwari A, Khan AA, Farooq S. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: an overview of promising healer. *J Med Plants Res.* 2012;6(27):4368-74.
101. Gandomani VT, Mahdavi AH, Rahmani HR, Riasi A, Jahanian E. Effects of different levels of clove bud (*Syzygium aromaticum*) on performance, intestinal microbial colonization, jejunal morphology, and immunocompetence of laying hens fed different n-6ton-3ratios. *Livest Sci.* 2014;167:236-48.
102. Landy N, Ghalamkari GH, Toghyani M. Performance, carcass characteristics, and immunity in broiler chickens fed dietary neem (*Azadirachta indica*) as alternative for an antibiotic growth promoter. *Livest Sci.* 2011;142:305-9.
103. Nunes-Pinheiro DCS, Leite AKRM, Farias VM, Braga LT, Lopes CAP. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. *Ciênc Anim.* 2003; 13(1):23-32.

104. Oliveira TB, Genovese MI. Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetics rats. *Food Res Int.* 2013;51(2):929-35.
105. Alezandro MR, Granato D, Genovese MI. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. *Food Res Int.* 2013;54:650-9.
106. Gonçalves AESS, Lellis-Santos C, Curi R, Lajolo FM, Genovese MI. Frozen pulp extracts of camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) attenuate the hyperlipidemia and lipid peroxidation of Type 1 diabetic rats. *Food Res Int.* 2014;64:1-8.
107. Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(1):37.
108. Ikarashi N, Takeda R, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K. (2011). The inhibition of lipase and glucosidase activities by acacia polyphenol. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2011.
109. Hong JC, Steinee T, Aufy A, Lien TF. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livest Sci.* 2012;144:253-62.
110. Calislar S, Gemci I, Kamalak A. Effects of Orego-Stim® on broiler chick performance and some blood parameters. *J Anim Vet Adv.* 2009;8(12):2617-20.
111. Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Beynen AC. Growth performance of broiler chickens fed a carboxymethyl cellulose containing diet with supplemental carvacrol and/or cinnamaldehyde. *Int J Poult Sci.* 2004;3(9):619-22.
112. Toghyani M, Toghyani M, Gheisari A, Ghalamkari G, Eghbalsaied S. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livest Sci.* 2011;138:167-73.
113. Li M, Cui JR, Ye Y, Min JM, Zhang LH, Wang K. Anti-tumour activity of Z-ajoene, a natural compound purified from garlic: antimetabolic and microtubule-interaction properties. *Carcinogenesis.* 2002; 23:573.
114. Park JH, Kang SN, Chu GM, Jin SK. Growth performance, blood cell profiles, and meat quality properties of broilers fed with *Saposhnikovia divaricata*, *Lonicera japonica*, and *Chelidonium majus* extracts. *Livest Sci.* 2014; 165:87-94.
115. Platel K, Srinivasan K. Digestive stimulant action of spices: a myth or reality? *Indian J Med Res.* 2004;119:167–79.

116. Amad AA, Maenner K, Wendler KR, Neumann K, Zentek J. Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult Sci.* 2011;90:2811–6.
117. Müller K, Blum NM, Kluge H, Muller AS. Influence of broccoli and various essential oils on performance and expression of xenobiotic- and antioxidant enzymes in broiler chickens. *Br J Nutr.* 2012;108:588–602.
118. Placha I, Takacova J, Ryzner M, Cobanova K, Laukova A, Stropfova V, Venglovska K, Faix S. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *Br Poult Sci.* 2014;55:105–14.
119. Karadas F, Pirgozliev V, Rose SP, Dimitrov D, Oduguwa O, Bravo D. Dietary essential oils improve the hepatic antioxidative status of broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2014;55:329–34.
120. Paraskeuas V, Fegeros K, Palamidi I, Hunger C, Mountzouris KC. Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, blood biochemical biomarkers and cytokines expression in broiler chickens fed different phytogetic levels. *Anim Nutr.* 2017;3:114-20.
121. Akbarian A, Golian A, Gilani A, Kermanshahi H, Zhaleh S, Akhavan A, Desmet S, Michiels J. Effect of feeding citrus peel extracts on growth performance, serum components, and intestinal morphology of broilers exposed to high ambient temperature during the finisher phase. *Livest Sci.* 2013;157:490-7.
122. Kiczorowska B, Al-Yasiry ARM, Samońska W, Marek A, Pyzik E. The effect of dietary supplementation of the broiler chicken diet with *Boswellia serrata* resin on growth performance, digestibility, and gastrointestinal characteristics, morphology, and microbiota. *Livest Sci.* 2016;191:117-24.
123. Danner MA, et al. Enraizamento de jaboticabeira 1 (*Plinia trunciflora*) por mergulhia aérea. *Rev Bras Frutic.* 2006;5(1):530-2.
124. Oliveira AL, Brunini MA, Salandini CAR, Bazzo FR. Caracterização tecnológica de jaboticabas Sabará provenientes de diferentes regiões de cultivo. *Rev Bras Fruticultura.* 2003;25(3):397-400.
125. Vieites RL, Daiuto ER, Moraes MR, Neves LC, Carvalho LR. Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jaboticaba armazenada sob diferentes temperaturas. *Rev Bras Fruticultura.* 2011;33(2):362-75.
126. Wu SB, Long C, Kennelly EJ. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Res Int.* 2013;54(1):148-59.
127. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr Res.* 2003;23(12):1719-26.

128. Soong YY, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.* 2004;88(3):411-7.
129. Lage FF. Casca de jaboticaba: inibição de enzimas digestivas, antioxidante, efeitos biológicos sobre fígado e perfil lipídico. [Tese] Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-graduação em Agroquímica; 2014.
130. Dragano NR, Marques A, Cintra DE, Solon C, Morari J, Leite-Legatti AV, Veloso LA, Marostica Jr MR. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. *Br J Nutr.* 2013;110(3):447-55.

CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) FRENTE CEPAS DE *Salmonella enterica*

RESUMO: Objetivou-se com o presente estudo avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração inibitória mínima do extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora* sobre diferentes cepas de *Salmonella enterica*. Neste estudo foram utilizadas as técnicas de microdiluição em caldo, disco-difusão e difusão em ágar por poço. O extrato de jabuticaba apresentou ação inibitória sobre as cepas de *Salmonella enterica* (cepa ATCC), *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium apenas quando empregado o método de difusão em ágar por poço. A concentração inibitória mínima do extrato determinada pelo método da microdiluição em caldo foi de 2000 µg/mL para *Salmonella enterica* e *Salmonella* Typhi, e 1000 µg/mL para os sorovares Heidelberg e Typhimurium. Conclui-se que a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *M. cauliflora* frente a diferentes estirpes de *Salmonella enterica* é considerada fraca ou inexistente.

Palavras-chave: ácido elágico, difusão em ágar, fitoquímicos, jabuticaba, microdiluição.

CHAPTER 2 - ANTIMICROBIAL ACTIVITY *in vitro* OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) FRONT *Salmonella enterica* STRAINS

ABSTRACT: The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial activity and to determine the minimum inhibitory concentration of *Myrciaria cauliflora* ethanolic extract on different strains of *Salmonella enterica*. Three methodologies were used for evaluation: broth microdilution, and agar diffusion by disc and well. The extract of jabuticaba showed inhibitory action to the strains of *Salmonella enterica*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Heidelberg. Furthermore, extract of jabuticaba only showed inhibitory action to *Salmonella* Typhimurium when used the method of diffusion in agar diffusion test by well. The minimum inhibitory concentration of the extract determined by the broth microdilution method was 2000 µg/mL for *Salmonella enterica* and *Salmonella* Typhi, and 1000 µg/mL for Heidelberg and Typhimurium serovars. It is concluded that the antimicrobial activity of *M. cauliflora* ethanolic extract against different strains of *Salmonella enterica* is considered weak or nonexistent.

Keywords: ellagic acid, diffusion in agar, jabuticaba, phytochemicals, microdilution.

INTRODUÇÃO

Os estudos químicos e farmacológicos dos fitoquímicos presentes nos extratos derivados de plantas tiveram um grande impulso nos últimos anos. Muitas dessas pesquisas têm como objetivo a obtenção de novos compostos que possuam propriedades antimicrobianas que sejam mais eficazes contra patógenos, tenham baixa toxicidade e causem menor impacto ambiental, quando comparadas às drogas tradicionalmente empregadas¹.

As propriedades antimicrobianas dos fitoquímicos são determinadas por suas características físico-químicas, como pH, solubilidade, pKa, polaridade². Conforme Kamel³, um importante mecanismo de ação de certos extratos vegetais pode ser sua capacidade de influenciar as características da superfície da célula bacteriana, como a hidrofobicidade, e conseqüentemente, alterar suas propriedades de virulência.

Para tanto, a confirmação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais pode ser determinada por diferentes técnicas *in vitro*, através de metodologias que produzam resultados confiáveis que possam ser reproduzidos e validados⁴. As técnicas mais empregadas são os métodos de disco-difusão e microdiluição em caldo, que são igualmente aceitáveis para mensurar a atividade de um potencial agente antimicrobiano contra determinada espécie bacteriana ou fúngica¹.

A espécie *Myrciaria cauliflora*, popularmente conhecida como “jabuticabeira”, “jabuticaba paulista”, “jabuticaba-do-mato” ou “jabuticaba-sabará”, é uma espécie arbórea pertencente à família Myrtaceae de ocorrência espontânea em grande parte do Brasil. Seus frutos são do tipo baga globosa, de casca avermelhada e polpa esbranquiçada, apresentando até quatro sementes^{5,6}. As propriedades biológicas encontradas na jabuticaba podem ser atribuídas à ampla quantidade de compostos polifenólicos presentes na espécie, como as antocianinas (glicosídeos penidínicos) e agliconas (cianidinas), taninos, isoquercitrina, miricetina e ácido elágico⁷⁻¹⁰. Considerando essa variedade de moléculas bioativas existentes na planta, ainda são escassos os estudos encontrados na literatura que avaliem seu potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas.

Neste contexto, as bactérias da espécie *Salmonella enterica* estão comumente associadas às doenças transmitidas por alimentos. Na maioria dos casos, a infecção em humanos é caracterizada como uma enterite aguda auto-limitante, entretanto, cepas mais virulentas podem atingir a corrente sanguínea e produzir quadros septicêmicos e, ocasionalmente, óbitos¹¹.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba contra diferentes sorovares de *Salmonella enterica*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) e da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Obtenção e processamento do resíduo

O extrato líquido padronizado em compostos fenólicos da jabuticaba foi processado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia – UFG. O resíduo utilizado nessa pesquisa foi o subproduto da produção de fermentado de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O Berg.], composto basicamente de sementes e cascas dos frutos, gentilmente cedidos pela Vinícola Jabuticabal, situada no município de Hidrolândia/GO (16° 55' 32.35" S 49° 21' 39.76" W). O resíduo foi dessecado a 40 °C em estufa com circulação de ar. Em seguida, a amostra foi moída em moinho de facas com tamis número 100 (150 µm) e o pó resultante do material vegetal devidamente acondicionado em sacos plásticos e armazenados a uma temperatura de -10°C.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação empregando como solvente álcool a 45% (v/v). O processo extrativo foi constituído por três etapas: 1 - pré-intumescimento: durante um intervalo de 2 horas com a proporção de 1 Kg do material vegetal com 3 L da mistura hidroalcoólica; 2 – repouso: a mistura anteriormente preparada foi deixada em repouso durante 24 horas, fase conhecida como maceração intermediária; 3 – empacotamento: transferência do material anterior para um percolador de 10 L, completando o volume com a mesma mistura hidroalcoólica e percolação com um fluxo de aproximadamente 0,2 mL/min¹².

Análises anteriores realizadas por Moreira¹³ revelaram que o extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba utilizado no presente estudo apresentou 14,26% de fenóis totais, 5,12% de taninos, 28,23% de flavonoides, 2,10% de proteína e 1,75% de extrato etéreo, além de ácidos graxos saturados mirístico (0,52%), palmítico (26,65%) e esteárico (2,92%); monoinsaturados palmitoléico (1,22%) e oléico (11,12%); e poli-insaturados linoléico (39,15%) e linolênico (8,21%). A concentração do ácido elágico foi determinada pelo método de cromatografia de alta eficiência (CLAE), que indicou 130,02 ± 0,62 µg/mL do extrato.

Preparação dos inóculos bacterianos

Inóculos bacterianos de *Salmonella enterica* ATCC 00150 (Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ) e *Salmonella* Typhi ATCC 10749 (STy) foram utilizadas como cepas padrão. Os isolados de *Salmonella* Typhimurium (ST) e de *Salmonella* Heidelberg (SH) foram obtidos a partir de amostras provenientes de frangos de corte e cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária – EVZ/UFG. As cepas foram suspensas em solução salina esterilizada (NaCl a 0,85%) até obtenção de turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, realizou-se uma diluição de 1:10 em salina a 0,85% de forma a se obter uma concentração de células bacterianas de 10^7 UFC/mL.

Padrão do ácido elágico

Para efeito de comparação nos testes de sensibilidade antimicrobiana foi utilizado o ácido elágico (E2250) como padrão, que foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, USA), apresentando 95% de pureza.

Verificação da contaminação do extrato etanólico

O extrato foi avaliado quanto à contaminação bacteriana ou fúngica previamente aos testes antimicrobianos, através de semeadura em meio ágar simples com incubação em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas para bactérias. Para pesquisa de fungos foi utilizado o meio ágar Sabouraud, que foi mantido à temperatura ambiente por cinco dias. Após a incubação foi observado o aparecimento ou não de colônias nos meios¹⁴.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de cascas e sementes de *M. cauliflora* frente a cepas de *Salmonella enterica* foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo Müeller-Hinton (MH), conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*¹⁵.

Pesou-se 0,02 g do extrato etanólico líquido e do padrão de ácido elágico em tubos esterilizados, acrescentou-se 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente e 9 mL de caldo MH (concentração dupla) em cada um deles, obtendo-se uma concentração final de 2000 µg/mL.

Alíquotas de 100 µL de MH (concentração dupla) foram distribuídas em placa de microtitulação de 96 poços em forma de “U” distribuídos em 12 colunas e 8 linhas. Na primeira coluna foram adicionados 100 µL do composto a ser testado (extrato de jabuticaba e o ácido elágico); depois, foram homogeneizados e retirados 100 µL de cada poço da coluna 1 para a coluna 2, e assim sucessivamente até a coluna 12, obtendo-se, então, as concentrações do extrato (2.000 a 1,95 µg/mL).

Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 5 µL do inóculo em cada poço da microplaca e incubou-se a 35°C por 24 horas. Decorrido o tempo, foram acrescentados a cada um dos orifícios 20 µL de uma solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5%, e as microplacas foram novamente incubadas a 35°C por mais 30 minutos. Em seguida, realizou-se a de leitura, onde o aparecimento de coloração vermelha era indicativo de crescimento bacteriano.

A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração do extrato etanólico de *M. cauliflora* ou ácido elágico (padrão) capaz de inibir o crescimento bacteriano. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com Holetz et al.¹⁶: $CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$ é considerada uma atividade antimicrobiana boa; $100 < CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$ atividade antimicrobiana moderada, $500 < CIM \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ fraca e $CIM > 1000 \mu\text{g/mL}$ inativa.

Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço

A técnica de difusão em disco foi realizada utilizando o método padrão recomendado pelo CLSI¹⁴ com modificações, onde os discos foram distribuídos na superfície do ágar e a quantidade de extrato será dispensada no centro de cada disco¹⁷.

Cada suspensão de microrganismo, preparada conforme descrito anteriormente, foi semeada (em duplicata), com auxílio de um suabe, em toda a superfície do meio ágar MH. Em seguida, os discos de papel-filtro (Whatman – tipo 3), de 6 mm de diâmetro foram distribuídos na superfície do ágar e 10 µL do extrato etanólico (nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5%) e o ácido elágico, dissolvidos em DMSO a 10%, foram dispensadas no centro de cada disco.

O teste de difusão por poço também foi realizado conforme atualizações do CLSI¹⁵, com adaptações, o qual se diferencia do teste de disco pela realização de orifícios de 6 mm de diâmetro no meio de ágar MH em placas de Petri, com o auxílio de um molde formando os poços. As placas foram inoculadas na superfície pelos micro-organismos com o

uso de um suabe e, então, os poços foram preenchidos com 50 μL do extrato na concentração a ser testada.

Em ambos os testes, foi utilizado como controle positivo um disco impregnado com 10 μg de gentamicina. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimetrada. Foram considerados com atividade inibitória os halos com diâmetro $\geq 6 \text{ mm}^1$.

Análise Estatística

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico de resíduo industrial de jabuticaba e do padrão do ácido elágico foi avaliada por teste descritivo, no qual foi observado apenas a formação dos halos de inibição e a presença de coloração indicativa de crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observado o crescimento de colônias bacterianas ou fúngicas no extrato etanólico de *M. cauliflora*, o que certifica que não havia microrganismos contaminantes no mesmo.

Nos ensaios de difusão em ágar pelo método de disco-difusão em meio sólido, verificou-se que o extrato etanólico de jabuticaba nas concentrações testadas e o padrão do ácido elágico não apresentaram atividade inibitória sobre as cepas de *Salmonella enterica* (Tabela 1).

TABELA 1 – Média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelas técnicas de disco e poço empregando o extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora*, padrão do ácido elágico e gentamicina frente às cepas de *Salmonella enterica*

| Bactérias* | Método disco-difusão | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|-------|-----|-------|------------------------------|-----------------------|
| | Concentração de extrato vegetal | | | | Ácido elágico (2000µg/mL) | Gentamicina (10µg) |
| | 100% | 50% | 25% | 12,5% | | |
| SE | - | - | - | - | - | 20,0mm |
| STy | - | - | - | - | - | 18,5mm |
| SH | - | - | - | - | 9,0 mm | 7,5mm |
| ST | - | - | - | - | 8,5 mm | 12,0mm |
| Método difusão em poço | | | | | | |
| SE | 7,5mm | - | - | - | - | 12,0mm |
| STy | 12,0mm | 9,5mm | - | - | - | 23,0mm |
| SH | 9,5mm | - | - | - | 11,0mm | 11,0mm |
| ST | 11,0mm | 8,5mm | - | - | 9,0mm | 12,0mm |

* SE: *Salmonella enterica* (ATCC); STy: *Salmonella* Typhi; SH: *Salmonella* Heidelberg; ST: *Salmonella* Typhimurium; - = ausência de halo de inibição

Conforme a Tabela 1, na técnica de difusão em poço foi verificada a inibição do crescimento de *Salmonella enterica*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium quando utilizado o extrato a 100%. Ao passo que se reduziu a concentração do material vegetal para 50%, a formação dos halos apenas foi observada para *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Typhimurium, o que indica diferentes níveis de suscetibilidade dos sorovares ao produto. A atividade antimicrobiana observada no presente estudo pode ser atribuída a grande concentração de compostos fenólicos, as antocianinas, presentes principalmente nas cascas dos frutos¹⁸⁻²¹.

As propriedades antimicrobianas de *M. cauliflora* utilizando a técnica de difusão em ágar também foram avaliadas em outros estudos. De Bona et al.¹ constataram a formação de halos de inibição contra *Salmonella* Typhimurium que possuíam diâmetro médio de

18,3 mm quando utilizado o extrato etanólico de jabuticaba na concentração de 100 mg/mL. Também Baldin²² ao utilizar concentrações do extrato aquoso de casca de jabuticaba que variaram entre 10 a 100%, relatou a formação de halos de inibição que variaram de 13 a 25 mm para *Salmonella* Enteritidis.

Os resultados diferentes encontrados nestes estudos são devido às diferentes concentrações do extrato utilizadas e às variações genéticas da espécie vegetal que alteram o teor dos fitoquímicos presentes nos tecidos da planta⁴. Além disso, outros aspectos parte da planta utilizada (raiz, caule, cascas, folhas, frutos ou sementes, folhas) e suas condições (secas ou frescas), variação geográfica, tipo de plantio, método de conservação e sua duração, técnica de extração, dentre outros podem afetar a composição química dos extratos e na concentração dos compostos bioativos, interferindo diretamente na atividade antimicrobiana^{23,24}.

De acordo com Nascimento et al.⁴, ainda há muitos questionamentos quanto à validade e viabilidade das informações obtidas por estes testes, visto que as características intrínsecas dos extratos e óleos vegetais, como volatilidade, insolubilidade em água e complexidade química podem interferir nos resultados obtidos.

Com a finalidade de avaliar a propriedade antimicrobiana dos fitoquímicos isoladamente, neste estudo foi utilizado o padrão de ácido elágico por ser este um dos compostos fenólicos encontrados em maior quantidade nas frutas de *M. cauliflora*²⁵ e, que possui potencial inibitório sobre microrganismos²⁶⁻²⁸. Os resultados observados indicam que em ambas as metodologias adotadas, o padrão do ácido elágico inibiu o crescimento de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium.

Conforme pode ser observado na Figura 1, houve diferenças nos resultados obtidos de acordo com a técnica empregada. No método de difusão em poço, houve inibição do crescimento de todas as estirpes testadas na concentração de 100% do extrato, ao passo que método de disco difusão, o mesmo efeito não foi observado. Esta divergência também foi reportado por De Bona et al.¹, que observaram melhor performance do extrato das folhas da jabuticabeira frente a microrganismos com a utilização da técnica de difusão em poço.

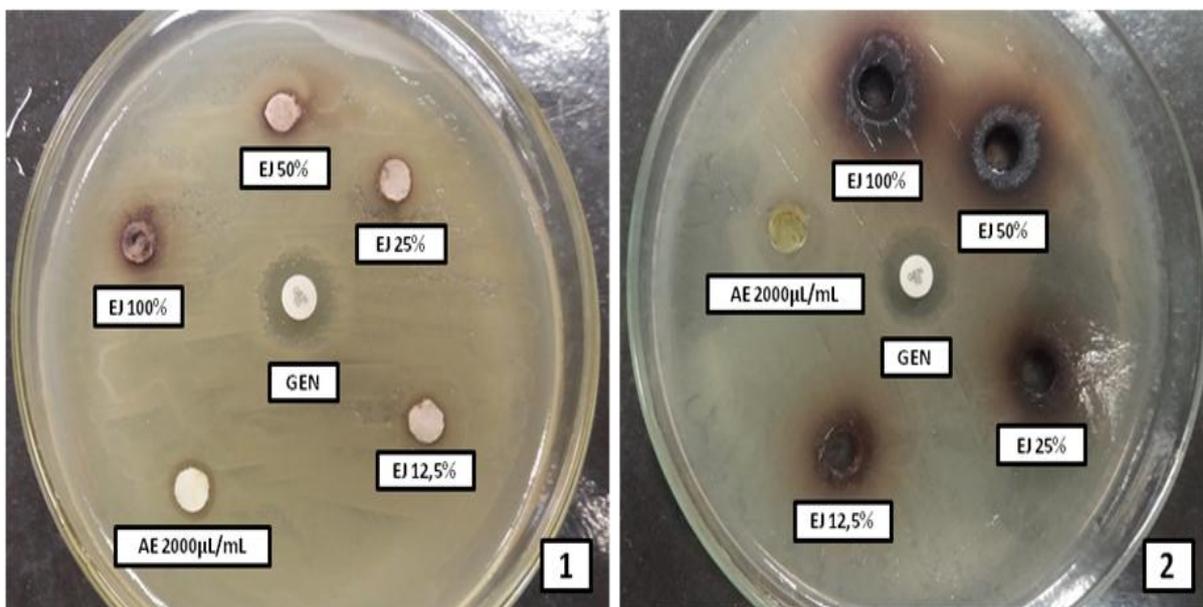


FIGURA 1 – Diferença na formação dos halos de inibição para *Salmonella* Typhimurium utilizando o método de disco difusão (1) e método de difusão em ágar (2). Legenda: EJ – extrato de jabuticaba; AE – padrão do ácido elágico; GEN: gentamicina.

As diferenças entre estas duas metodologias encontra respaldo em Alves et al.³⁰, que em seu estudo afirmam que ocorre melhor difusão das substâncias antimicrobianas na técnica de difusão em poço, o que permite maior contato entre as soluções testadas e os microrganismos. O papel filtro Whatman, que é composto basicamente de celulose e glicose monomérica, possui muitos grupos hidroxila livres, que podem se ligar ao extrato vegetal e prejudicar a sua difusibilidade no meio³¹. Associado a isso, o método do poço proporciona uma difusão radial das substâncias antimicrobianas avaliadas, na qual a interferência de partículas em suspensão é menor que no método de difusão em disco³², além de utilizar uma quantidade maior de extrato, aumentando a concentração das substâncias ativas.

O protocolo experimental proposto para o teste de CIM possuía três controles: um para o crescimento bacteriano, outro para a esterilidade do extrato etanólico de *M. cauliflora* e do padrão do ácido elágico, e finalmente, outro para o DMSO. Durante o ensaio foi possível observar que o caldo MH e o DMSO nas concentrações empregadas não tiveram efeito antimicrobiano sobre as cepas de *Salmonella*.

Na Tabela 2 estão descritos os resultados obtidos no teste de CIM do extrato de jabuticaba e do padrão do ácido elágico para os microrganismos avaliados.

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora* e do padrão do ácido elágico frente a diferentes cepas de *Salmonella enterica*

| Soluções-teste | Bactérias | | | |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | SE | STy | SH | ST |
| <i>Myrciaria cauliflora</i> | 2000 µg/mL | 2000 µg/mL | 1000 µg/mL | 1000 µg/mL |
| Ácido elágico | 2000 µg/mL | 2000 µg/mL | 2000 µg/mL | 1000 µg/mL |

SE: *Salmonella enterica*; STy: *Salmonella* Typhi; SH: *Salmonella* Heidelberg; ST: *Salmonella* Typhimurium.

O método de microdiluição em caldo permitiu a visualização da inibição do extrato e do ácido elágico em concentrações menores que aquelas utilizadas nos testes de difusão. De acordo com Zgoda e Porter³³, o método da CIM em caldo mostra-se mais confiável para avaliação da atividade de produtos naturais frente a microrganismos, possibilitando uma melhor triagem devido à utilização de uma escala em nanogramas ou microgramas dos extratos e óleos vegetais.

No teste de CIM o crescimento de *Salmonella enterica* e *Salmonella* Typhi e foi inibido na maior concentração do extrato etanólico e do padrão do ácido elágico testados (2000 µg/mL), o que indica que estes produtos não possuem atividade antimicrobiana contra estas cepas¹⁶. Quando avaliado pelo método de difusão em ágar, o extrato promoveu a formação de halo de inibição que variou de 10 a 12 mm frente à estirpe de *Salmonella* Typhi. Este resultado se deve as concentrações do produto vegetal que foi utilizada no teste mencionado, que foi superior daquela empregada na metodologia de microdiluição em caldo (Figura 2).

Ao avaliar a suscetibilidade de *Salmonella* Typhimurium frente ao padrão do ácido elágico, verificou-se que foi o único isolado inibido na concentração de 1000 µg/mL, que de acordo com Holetz et al.¹⁶ indica fraco potencial antimicrobiano. A mesma estirpe também apresentou o crescimento inibido pela mesma concentração do extrato de jabuticaba.

Como pode ser observado na Figura 2, o crescimento de *Salmonella* Heidelberg foi inibido no poço contendo 1000 µg/mL do extrato de jabuticaba, portanto, a atividade antimicrobiana é considerada fraca¹⁶. Entretanto, o padrão do ácido elágico não foi capaz de inibir *Salmonella* Heidelberg nesta mesma concentração, indicando que a atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato é resultado do sinergismo entre fitoquímicos presentes no material vegetal, ou que a inibição observada no presente estudo seja efeito de outra substância proveniente de outra classe de metabólitos secundários.

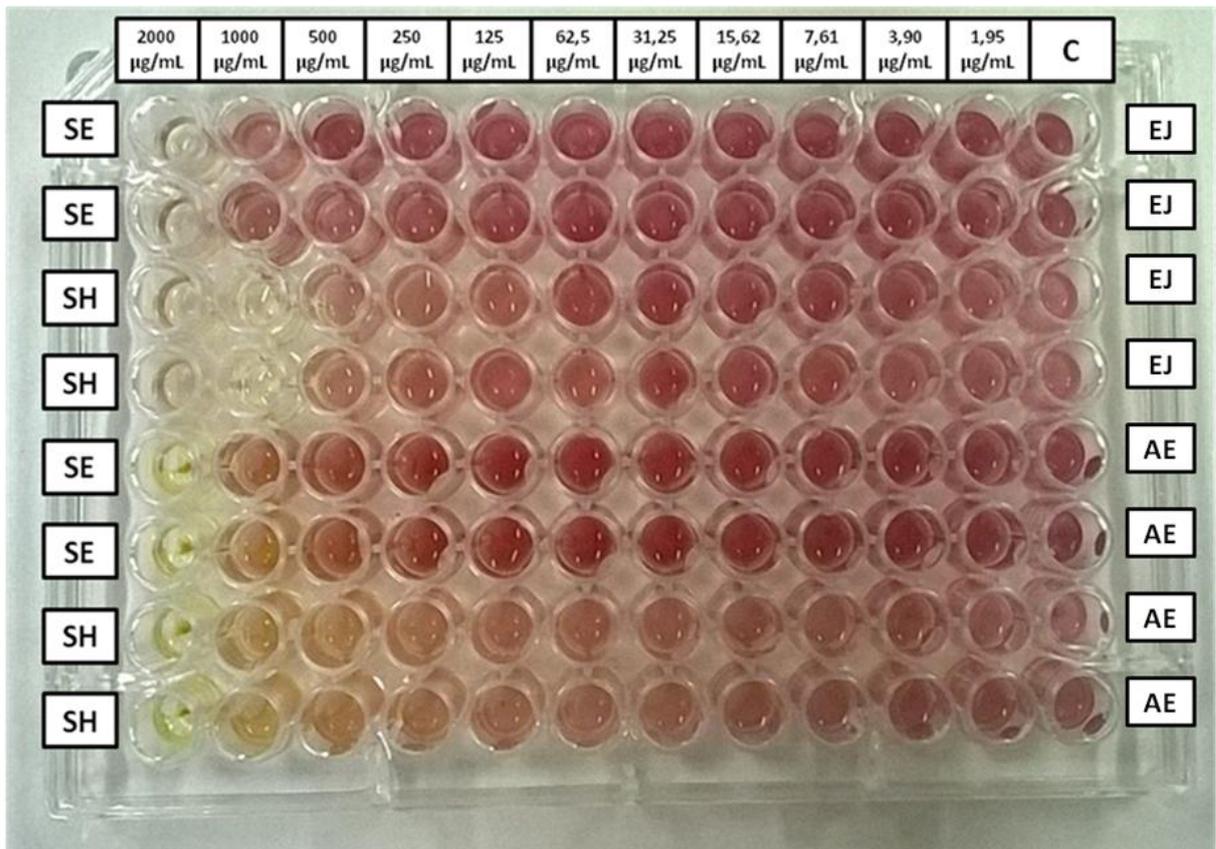


FIGURA 2 – Resultado do teste de Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora* (EJ) e do padrão do ácido elágico (AE) frente a isolados de *Salmonella enterica* (SE) e *Salmonella Heidelberg* (SH). A coloração vermelha indica o crescimento microbiano. Controle (C).

CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Myrciaria cauliflora* frente a diferentes cepas de *Salmonella enterica* é considerada fraca quando empregada as técnicas de disco-difusão, difusão em ágar por poço e microdiluição em caldo.

REFERÊNCIAS

1. De Bona EAM, Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, De Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e alcoólicos. *Arq Inst Biol.* 2014;81(3):218-25.
2. Negi PS. Plants extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food applications. *Int J Food Microbiol.* 2012;156:7-17.
3. Kamel C. Natural plant extracts: Classical remedies bring modern animal production solutions. *Cahiers Options Méditerranéennes;* 2001; 54: 31-8.
4. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, Trindade RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. 2006;17(1):108-13.
5. Lima AJB, Corrêa AD, Alves APC, Abreu CMP, Dantas-Brarros AM. Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Arch Latinoam Nutr.* 2008;58(4):416-21.
6. Citadin I, Danner MA, Sasso SAZ. Jaboticabeiras. *Rev Bras Fruticultura.* 2010;32:0-1.
7. Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chem.* 2008;109(4):883-90.
8. Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int.* 2011;44(5):1150-60.
9. Wu SB, Dastmalchi K, Long C, Kennelly EJ. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. *J Agric Food Chem.* 2012;60(30):7513–25.
10. Borges LL, Conceição EC, Silveira D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. *Food Chem.* 2014;153:224–33.
11. Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, Barzilay EJ. Antimicrobial resistance among invasive nontypoidal *Salmonella enterica* in the United States, National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996–2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1148-54.
12. List PH, Schmidt T. *Phytopharmaceutical Technology.* Florida, USA: CRC Press; 2000
13. Moreira JS. Extrato padronizado de jaboticaba na alimentação de frangos e poedeiras comerciais [Tese]. Goiânia – GO: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2017.

14. Saraiva RMC. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas. [Dissertação]. Belém – PA: Universidade Federal do Pará, Instituto das Ciências da Saúde; 2012.
15. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
16. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(7):1027-31.
17. Maya-Araújo YLF, Mendonça LS, Orellana SC, Araújo ED. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. Scientia Plena. 2011;7(4):1-4.
18. Caillet S, Cote J, Sylvain JF, Lacroix M. Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. Food Control. 2012; 23:419–28.
19. Lima AJ, Correa AD, Saczk AA, Martins MP, Castilho RO. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. Rev Bras Fruticultura. 2011;33:877–87.
20. Abe LT, Lajolo FM, Genovese MI. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). J Sci Food Agric. 2012; 92:1679–87.
21. Leite-Legatti AV, Batista AG, Dragano NRV, Marques AC, Malta LG, Riccio MF, Eberlin MN, Machado ART, Carvalho-Silva LB, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Pastore GM, Maróstica Júnior MR. Jaboticaba peel: antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. Food Res Int. 2012;49:596-603.
22. Baldin JC, Michelin EC, Polizer YJ, Rodrigues I, De Godoy SHS, Fregonesi RP, Pires MA, Carvalho LT, Fávoro-Trindade CS, De Lima CG, Fernandes AM, Trindade MA. Microencapsulated jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. 2016;188:15-21.
23. Windisch W, Schedle K, Plitzner C, et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. J Anim Sci. 2007; 86(14) Suppl, p. E140-8.
24. Otrrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(2):302-7.
25. Alezandro MR, Dubé P, Desjardins Y, Lajolo FM, Genovese MI. Comparative study of chemical and phenolic composition of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. Food Res Int. 2013;54:468-77.

26. Fyhrquist P, Laakso Y, Marco SG, Julkunen-Tiito R, Hiltunen R. Antimycobacterial activity of ellagitannin and ellagic acid derivate rich crude extracts and fractions of five selected species of *Terminalia* used for treatment of infectious disease in African tradition medicine. *S Afr J Bot.* 2014;90:1-16.
27. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 1991;30(12):3875-83.
28. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007;73:461-7.
29. Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia.* 2000;71:58.
30. Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim Nova.* 2008;31:1224-29.
31. Burgess JG, Jordan EM, Bregu M, Mearns-Spragg A, Boyd KG. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J Biotechnol.* 1999;70:27-32.
32. Silveira LMS, Olea RSG, Mesquita JS, Da Cruz ALN, Mendes JC. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicada à extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Rev Bras Farm.* 2009;90(2):124-8.
33. Zgoda JR, Porter JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol.* 2001;39(3):221- 5.

CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) EM OVOS FÉRTEIS DE MATRIZES PESADAS E PINTOS INFECTADOS COM *Salmonella* HEIDELBERG

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do extrato etanólico de cascas e sementes de *Myrciaria cauliflora* em ovos férteis e pintos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Heidelberg. Foram utilizados 320 ovos férteis distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso em quatro tratamentos com oito repetições cada: CN – grupo controle negativo que recebeu solução salina esterilizada a 0,85% na casca; EJ – grupo que recebeu apenas o extrato na casca; SH – grupo que recebeu apenas o inóculo bacteriano na casca; e SH + EJ – grupo que recebeu o inóculo bacteriano e o extrato na casca. Os ovos foram incubados e os não eclodidos foram submetidos ao embriodiagnóstico e processados para pesquisa de *Salmonella* nos embriões. Os pintinhos nascidos foram alojados até os 10 dias de idade, período em que se realizou a coleta e processamento de amostras para pesquisa de *Salmonella*, bioquímica sérica e hemograma. Verificou-se que o extrato promoveu menor eclodibilidade e maior mortalidade embrionária. O isolamento de *Salmonella* foi maior nas amostras de embriões e mecônio do grupo que recebeu o extrato. Aos 10 dias de idade o extrato reduziu a colonização dos órgãos e excreção fecal de *Salmonella*. O extrato reduziu o hematócrito e o nível de colesterol sérico. Conclui-se que a utilização do extrato etanólico de casca e sementes de jabuticaba em ovos incubáveis não é viável.

Palavras-chave: eclodibilidade, embriões, fitogênicos, jabuticaba, salmonelose.

CHAPTER 3 - USE OF ETHANOLIC EXTRACT OF JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) IN FERTILE EGGS OF FEMALE BROILER BREEDERS AND CHICKENS INFECTED WITH *Salmonella* HEIDELBERG

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of ethanolic extract of peels and seeds by *Myrciaria cauliflora* in fertile eggs and chickens experimentally inoculated *Salmonella* Heidelberg. 320 fertile eggs distributed in a completely randomized design with four treatments each with eight replications: CN - negative control received 0.85% sterile saline in shell; EJ - group that received only the extract in shell; SH - group that received only the bacterial inoculum in shell; and SH + EJ - group that received the bacterial inoculum and the extract in shell. The eggs were incubated and the non hatched embryos were submitted to embryodiagnosis and processed for *Salmonella* in the embryos. The chicks that born were yielded until 10 days of age, during this period samples were collected and processed to isolate *Salmonella*, serum biochemistry and hemogram as well. Was verified that the extract promoted lower hatchability and higher embryonic mortality. The *Salmonella* isolation was higher in the embryo and meconium samples of group that received the extract. At 10 days of yield the extract reduced the *Salmonella* excretion and organs colonization. The extract reduced the hematocrit and serum cholesterol level. It is concluded that the use of jabuticaba ethanolic extract in hatching eggs is not feasible.

Keywords: embryos, hatchability, jabuticaba, phytochemicals, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

A penetração de *Salmonella* na casca de ovos férteis pode propiciar a infecção do embrião em formação, provocando mortalidade embrionária e pós-eclosão¹. Além disso, a presença de *Salmonella* durante a incubação pode favorecer a disseminação do agente para outros setores da granja, atingindo aves em crescimento e, eventualmente, carcaças processadas e o consumidor².

Salmonella Heidelberg é citado como o quarto sorovar mais isolado em carnes comercializadas e rações de animais nos Estados Unidos³. No Brasil, este sorovar é um dos mais envolvidos com surtos de intoxicação alimentar devido ao consumo de carne de frango e ovos contaminados⁴. Embora a maioria das infecções em humanos causada por *Salmonella* Heidelberg produza quadros leves a moderados, em determinadas situações pode ocorrer complicações graves como septicemia, miocardite, infecções extraintestinais e morte^{5,6}.

Neste contexto, o emprego das substâncias bioativas derivadas das plantas contra a invasão de microrganismos patogênicos em ovos férteis pode ser promissor devido à atividade antimicrobiana que apresentam. O Brasil, pela sua rica biodiversidade e condições climáticas favoráveis à agricultura e fruticultura possui grande potencial para o desenvolvimento destas novas tecnologias.

Myrciaria cauliflora é uma espécie arbórea, membro da família Myrtaceae, conhecida popularmente como jabuticaba. A espécie está presente em regiões de clima temperado, como a Austrália, noroeste da Índia e América do Sul. A planta sobrevive em vários tipos de solo, e no Brasil pode ser encontrada desde o Pará ao Rio Grande do Sul⁸⁻¹¹.

Durante o beneficiamento dos frutos da jabuticabeira para produção de sucos, sorvetes, geleias, fermentados, destilados, compotas, licor e vinagre, as cascas e sementes são desprezadas, representando aproximadamente 50% do fruto. Sabe-se que essas partes da planta são ricas em compostos polifenólicos, como as antocianinas (glicosídeos penidínicos) e agliconas (cianidinas), taninos, isoquercitrina, miricetina e ácido elágico, as quais possuem grande potencial antimicrobiano¹²⁻¹⁵.

Apesar de possuir uma ampla variedade de substâncias antimicrobianas no resíduo dos frutos da jabuticaba, ainda são poucos os estudos que avaliam a sua atividade sobre microrganismos. Estudos realizados *in vitro* já descreveram a inibição do crescimento de cepas de *Klebsiella pneumoniae*¹⁶, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*¹⁷.

Contudo, sabe-se que grande parte dos metabólitos secundários vegetais podem apresentar propriedades tóxicas, promovendo alterações fisiológicas temporárias ou

permanentes nos animais, principalmente ao afetar o funcionamento de órgãos importantes como o fígado, que é fonte de vários componentes do soro sanguíneo, como ureia, albumina e vários fatores de coagulação^{18,19}. Além disso, a avaliação dos parâmetros hematológicos e sorológicos é útil para o diagnóstico de condições patológicas. Não há relatos na literatura sobre a indução de alterações sorológicas ou hematológicas promovidas pelo extrato etanólico de *M. cauliflora*, o que é de fundamental importância para que se possa assegurar níveis seguros da utilização deste produto nos animais.

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos do extrato etanólico de cascas e sementes de *M. cauliflora* sobre *Salmonella* Heidelberg experimentalmente inoculada na casca de ovos férteis de frangos de corte e na saúde dos pintos eclodidos até os 10 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

O protocolo experimental utilizado nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA – UFG sob o n° 107/2015.

Delineamento Experimental

Foram utilizados 320 ovos férteis da linhagem Cobb 500, obtidos de granja de matrizes em início de produção, localizada na região Centro-Oeste do Brasil, que foram transportados em condições ambientais ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária, onde foram identificados e distribuídos em delineamento inteiramente causalizado em quatro tratamentos com oito repetições com 10 ovos por repetição.

Os tratamentos adotados foram: T1 – inoculado com solução salina a 0,85% na casca – controle negativo (CN); T2 – inoculado com o extrato vegetal na casca (EJ); T3 – inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca (SH); T4 – inoculado com *Salmonella* Heidelberg e com extrato vegetal na casca (SH + EJ).

Preparação do inóculo

O inóculo foi elaborado com *Salmonella* Heidelberg obtida de amostras provenientes de frangos de corte isoladas pelo Laboratório de Bacteriologia, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e tipificada pelo Laboratório FIOCRUZ-RJ.

A cepa foi replicada em ágar verde brilhante e incubada a 37°C por 24 horas. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantida a 4°C e em uma concentração de $3,8 \times 10^7$ UFC/mL, ajustada com auxílio da escala de Mac Farland²⁰ e confirmada por plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37°C por 24 horas.

Obtenção do extrato etanólico de cascas e sementes *Myrciaria cauliflora*

O extrato líquido padronizado em compostos fenólicos da jabuticaba foi processado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia – UFG. O resíduo utilizado nessa pesquisa foi o subproduto da produção de fermentado de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O Berg.], composto basicamente de sementes e

cascas dos frutos, gentilmente cedidos pela Vinícola Jabuticabal, situada no município de Hidrolândia/GO (16° 55' 32.35" S 49° 21' 39.76" W). O resíduo foi dessecado a 40 °C em estufa com circulação de ar. Em seguida, a amostra foi moída em moinho de facas com tamis número 100 (150 µm) e o pó resultante do material vegetal devidamente acondicionado em sacos plásticos e armazenados a uma temperatura de -10°C.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação empregando como solvente álcool a 45% (v/v). O processo extrativo foi constituído por três etapas: 1 - pré-intumescimento: durante um intervalo de 2 h com a proporção de 1 Kg do material vegetal com 3 L da mistura hidroalcoólica; 2 – repouso: a mistura anteriormente preparada foi deixada em repouso durante 24 h, fase conhecida como maceração intermediária; 3 – empacotamento: transferência do material anterior para um percolador de 10 L, completando o volume com a mesma mistura hidroalcoólica e percolação com um fluxo de aproximadamente 0,2 mL/min²¹.

Análises anteriores realizadas por Moreira²² revelaram que o extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba utilizado no presente estudo apresentou 14,26% de fenóis totais, 5,12% de taninos, 28,23% de flavonoides, 2,10% de proteína e 1,75% de extrato etéreo, além de ácidos graxos saturados mirístico (0,52%), palmítico (26,65%) e esteárico (2,92%); monoinsaturados palmitoléico (1,22%) e oléico (11,12%); e poli-insaturados linoléico (39,15%) e linolênico (8,21%). A concentração do ácido elágico foi determinada pelo método de cromatografia de alta eficiência (CLAE), que indicou 130,02 ± 0,62 µg/mL do extrato.

Inoculação dos ovos

Os ovos foram acondicionados em quatro incubadoras artificiais, modelo IP130 – Premium Ecológica, com capacidade para 120 ovos por máquina, viragem automática a cada quatro horas e circulação de ar forçada através de ventilador. A temperatura de incubação foi ajustada para 37,0 – 37,5°C e umidade relativa para 62 a 68%, de acordo com French²³. Para evitar possíveis contaminações cruzadas, os ovos dos grupos contaminados e não contaminados foram mantidos em salas separadas, com condições ambientais semelhantes.

Os procedimentos de inoculação foram realizados ao 11º dia de incubação, com material esterilizado e em câmara de segurança biológica classe II. Antes da inoculação, foi realizada a ovoscopia de cada ovo e foram retirados do experimento aqueles que não apresentaram embriões viáveis. Nos tratamentos EJ e SH + EJ, inicialmente, os ovos foram impregnados com 0,3 mL do extrato vegetal com o auxílio de uma pipeta automática, que foi

espalhado pela superfície do ovo com as mãos revestidas com luvas. Após a secagem do extrato, procedeu-se a inoculação com solução salina tamponada estéril a 0,85% ou com *Salmonella* Heidelberg, seguindo o mesmo procedimento adotado para os demais tratamentos.

Os ovos inoculados na casca com *Salmonella* Heidelberg foram expostos ao inóculo por contato com as mãos revestidas com luvas descartáveis, simulando uma possível contaminação cruzada. Com o auxílio de pipeta automática, 0,3 mL de solução salina tamponada a 0,85% contendo $3,8 \times 10^7$ UFC/mL foi depositado nas mãos revestidas com as luvas. Cada ovo foi mantido por um período de 20 segundos nas luvas contaminadas para que a superfície fosse umedecida. O mesmo foi feito com os ovos do grupo CN empregando-se a solução salina esterilizada a 0,85%.

Análise do mecônio

Após a eclosão dos pintos provenientes de ovos inoculados e controles, foram colhidos os mecônios por suabe cloacal ou por compressão na região dorso-ventral dos cecos. Foi empregada a análise proposta em Georgia Poultry Laboratory²⁴. As amostras de mecônio foram incubadas em caldo selenito cistina a 37°C por 24 horas. Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas do caldo foram plaqueadas por esgotamento em estrias para meios seletivos (ágar McConkey, Hektoen e ágar Verde Brilhante) e incubados a 37°C por 24 horas.

A leitura foi realizada através de UFC com características morfológicas de *Salmonella*. De três a cinco UFC por placa foram transferidas individualmente para tubos contendo ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Os tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste de urease, produção de indol e H₂S, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato. Isolados com reações bioquímicas compatíveis com *Salmonella* foram submetidos ao teste sorológico com soro polivalente anti-O e remetidos à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em ágar nutriente para confirmação do sorovar isolado

Rendimento de incubação

A eclodibilidade de ovos foi calculada pelo número de ovos eclodidos multiplicado por 100, dividido pelo número de ovos férteis.

Embriodiagnóstico

Após 504 horas de incubação, os ovos que não eclodiram foram submetidos ao embriodiagnóstico para determinação do período de mortalidade embrionária.

Aproximadamente 15% dos embriões de cada tratamento foram coletados para pesquisa de *Salmonella* que foi realizada de acordo com o proposto em Georgia Poultry Laboratory²⁴, conforme já descrito.

O período de mortalidade foi considerado de acordo com as descrições: mortalidade intermediária (M2) com embriões mortos de cinco a 17 dias; mortalidade tardia (M3) com embriões mortos de 18 a 21 dias; e mortalidade total (MT), resultado da soma das mortalidades intermediária e tardia. A mortalidade inicial (embriões mortos até sete dias) não foi considerada neste estudo, já que os ovos receberam os tratamentos somente no 11º dia de incubação.

Alojamento das aves

As aves nascidas oriundas dos ovos inoculados e não inoculados foram mantidas em alojamentos separados de acordo com os quatro tratamentos já descritos, em quatro repetições com uma ave em cada. Os animais foram mantidos em baterias de aço galvanizado com quatro andares, equipadas com comedouros e bebedouros do tipo lineares e bandejas para retirada de excretas, mantendo-se a mesma ambiência entre eles. As baterias foram aquecidas com lâmpadas incandescentes (uma por andar) de 60 W até os 10 dias de idade.

Durante todo o período experimental, as aves receberam alimentação e água *ad libitum*. A ração pré-inicial utilizada durante o experimento foi à base de milho moído e farelo de soja, sem adição de promotores de crescimento e formulada de acordo com as recomendações Rostagno et al.²⁵.

TABELA 1 - Composição percentual da ração experimental fornecida às aves durante o período experimental (1 - 10 dias de idade)

| Ingredientes (g/kg) | Pré-inicial (1-10 dias) | Nutrientes*** | |
|----------------------------|--------------------------------|----------------------|-------|
| Milho grão | 554,03 | EM (kcal/kg) | 2.950 |
| Farelo de soja (45%) | 38,20 | PB (%) | 22,20 |
| Óleo de soja | 20,83 | Ca (%) | 0,92 |
| Calcário | 9,40 | P disp (%) | 0,47 |
| Fosfato bicálcico | 19,07 | Na (%) | 0,22 |
| Sal comum | 5,07 | Lis Total (%) | 1,31 |
| L-treonina | 1,14 | Met+ Cis Total (%) | 0,94 |
| L-lisina HCL | 2,90 | Met Total (%) | 0,65 |
| DL-metionina | 3,63 | | |
| Premix vitamínico* | 1,00 | | |
| Premix mineral** | 0,50 | | |
| Inerte (amido) | 1,00 | | |

* Suplemento vitamínico (níveis de garantia por kg do produto): vit. A, 1.680.000 UI; vit.D 3, 400.000 UI; vit. E, 3500 mg; vit. K, 360 mg; vit. B1, 436,50 mg; vit. B2, 1.200 mg; vit. B6, 624 mg; vit. B12, 2.400mcg; ác. Fólico, 200 mg; ác. pantotênico, 3.120 mg; niacina, 8.400 mg; biotina, 10.000 mcg.

** Suplemento mineral (níveis de garantia por kg do produto): zinco, 17.500 ppm; ferro, 12.500 ppm; cobre, 2.000 ppm; iodo, 187,50 ppm; selênio, 75 ppm.

*** EM: energia metabolizável; PB: proteína bruta; Ca: cálcio; P disp: fósforo disponível; Na: sódio; Lis: lisina; Met+Cis: metionina+cistina; Met: metionina.

Pesquisa de *Salmonella* em órgãos e fezes

Aos 10 dias de idade foi realizada a eutanásia de uma ave por repetição, totalizando quatro aves por tratamento. Os animais foram previamente submetidos a jejum alimentar de oito horas e insensibilizados por inalação de CO₂ para posterior sangria através da secção da artéria femoral. Foram coletadas amostras de fígado, baço, tonsila cecal, conteúdo intestinal e saco da gema para proceder a pesquisa de *Salmonella* que foi realizada de acordo com o proposto em Georgia Poultry Laboratory²⁴ conforme anteriormente descrito.

Bioquímica sérica e parâmetros hematológicos

Paralelamente, foram coletados 5 mL de sangue por venopunção na região coxofemoral, dos quais 4 mL foram acondicionados em tubo sem anticoagulante contendo acelerador de retração de coágulo e gel de separação para realização da bioquímica sérica e 1 mL foi transferido para tubo comercial contendo anticoagulante fluoreto de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) K3 para hematócrito e hemoglobina. As análises foram realizadas no Laboratório Multiuso da Pós- graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG.

A determinação dos teores séricos de proteína total, albumina, globulina, triglicerídeos, glicose, colesterol, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), creatinina, ácido úrico e ureia foi realizada a partir das alíquotas de soro

obtidos dos tubos com sangue sem anticoagulante após centrifugação a 2800 rpm. As alíquotas foram organizadas em tubos de polipropileno, tipo *Eppendorf* e congelados até o momento da análise a - 20°C. Todas as análises bioquímicas foram realizadas com kit comercial Labtest® em analisador automático Wiener Lab® CM 200. Também foram determinados os teores séricos de creatinina mediante a utilização de kits comerciais (Labtest®). As leituras foram realizadas no analisador bioquímico semi-automático Bio® 2000. Para a determinação de globulina foi realizado o cálculo da diferença entre as proteínas totais e albumina. A atividade da AST foi determinada pelo método ultravioleta (UV) otimizado, sem piridoxal fosfato, a GGT pelo método cinético utilizando-se como substrato glutamyl-p-nitroanilida.

A contagem do número de eritrócitos e leucócitos foi realizada pelo método do hemocitômetro, em Câmara de Neubauer, com solução de Natt e Herrick²⁶. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina com leitura colorimétrica realizada em espectrofotômetro semiautomático modelo BIO 2000 (BIOPLUS®), onde foi utilizado o kit comercial (Doles®) conforme as recomendações de Santos²⁵. A percentagem de hematócrito (Htc) foi determinada pelo método do microhematócrito, de acordo com Santos²⁷ e Goldenfarb et al.²⁸. Posteriormente, foram calculados os índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio [VCM = (Htc x 10)/eritrócitos]; Hemoglobina Corpuscular Média [HCM = (Hb x 10)/eritrócitos]; e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média [CHCM = (Hb/Htc) x 100], conforme Wintrobe²⁹. A contagem diferencial de heterófilos, linfócitos e plaquetas foi obtida mediante leitura dos esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico Panótico rápido, realizada em microscópio utilizando-se aumento 100 x em óleo de imersão.

Análise Estatística

Os resultados de eclodibilidade, mortalidade embrionária, contagem de heterófilos e linfócitos e parâmetros bioquímicos sanguíneos e hematológicos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para os estudos de colonização de *Salmonella* Heidelberg em amostras de embriões e pintos foi utilizado o teste de χ^2 . Para realizar as análises estatísticas foi empregado o programa estatístico R, versão 3.2.2³⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão demonstrados os resultados de eclodibilidade e mortalidade embrionária.

TABELA 2 – Valores médios para os parâmetros de incubação em cada um dos tratamentos experimentais

| Variáveis | *CN | EJ | SH | SH + EJ | P | CV (%) |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
| Eclodibilidade % | 85,71 ^a | 11,25 ^b | 83,5 ^a | 10,0 ^b | <0,001 | 22,10 |
| Mortalidade Intermediária (%) | 4,28 ^b | 73,75 ^a | 1,25 ^b | 72,50 ^a | <0,001 | 26,99 |
| Mortalidade Tardia (%) | 10 | 6,25 | 15 | 10 | 0,4085 | 98,43 |
| Mortalidade Embrionária Total (%) | 14,28 ^b | 80,0 ^a | 16,25 ^b | 82,5 ^a | 0,001 | 25,60 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Como consta na Tabela 2, houve efeito ($P < 0,05$) da adição do extrato vegetal sobre a eclodibilidade, mortalidade embrionária, independente da inoculação com *Salmonella*. Também nota-se que o agente inoculado não influenciou nenhum dos parâmetros analisados ($P > 0,05$), visto que o grupo que somente recebeu a bactéria (SH) apresentou resultados semelhantes aos do grupo controle (CN).

Após a aplicação do extrato vegetal na casca notou-se a formação de uma película viscosa de difícil secagem (Figura 1), que provavelmente ocluiu os poros presentes na mesma. Essa obstrução pode ter impedido as trocas gasosas entre o ambiente e o embrião, o que provavelmente provocou os altos índices de mortalidade embrionária e a baixa eclodibilidade.



FIGURA 1 – Aparência dos ovos após a aplicação do extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba.

Esta justificativa encontra respaldo nos estudos de Christesen et al.³¹, os quais afirmaram que embrião respira através da difusão do O₂ pelos inúmeros microporos presentes na casca, mecanismo biológico denominado condutância da casca, que determina a quantidade de energia destinada ao embrião, as perdas de água e de calor, e ainda a maturação dos seus tecidos e início da eclosão. Como a condutância da casca foi afetada pelo extrato, o desenvolvimento dos embriões foi prejudicado, com mortalidade acima de 70% entre 11º e 13º dia de incubação.

Conforme observado nas Tabelas 3 e 4, *Salmonella* não foi isolada nem nas amostras dos grupos controle negativo (CN) e nem nas que receberam apenas o extrato de jabuticaba (EJ), o que certifica que não houve contaminação cruzada entre os tratamentos inoculados e não inoculados com *Salmonella* Heidelberg.

TABELA 3 – Frequência de isolamento de *Salmonella* Heidelberg em amostras de embriões e mecônio de pintos recém-eclodidos de cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | Embriões | Mecônio |
|------------------|----------|---------|
| | (%) | (%) |
| CN | 0 | 0 |
| EJ | 0 | 0 |
| SH | 66,7 | 14,3 |
| SH + EJ | 71,4 | 80,0 |
| <i>P</i> valor** | 0,004 | 0,0404 |

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

**Teste do qui-quadrado de Pearson

A presença de *Salmonella* nos embriões e mecônio dos tratamentos que receberam o inóculo bacteriano comprova que o agente penetrou pela casca, transpôs os mecanismos de defesa e se disseminou pelas diferentes estruturas do ovo fértil, permanecendo viável até a eclosão dos pintos. Estes resultados encontram respaldo em Raghianti³², que observou a migração da *Salmonella* Heidelberg para as estruturas internas do ovo de mesa após 168 horas do contato com a casca.

Ao comparar os resultados dos tratamentos, verifica-se que os embriões ($P=0,004$) e mecônio dos pintos ($P=0,0404$) do grupo inoculado que recebeu o extrato (SH + EJ) obtiveram maior frequência de isolamento que o grupo controle positivo (SH). Este resultado sugere que o extrato facilitou a entrada do microrganismo pelos poros da casca. No presente estudo foi observado que, durante a aplicação do extrato sobre os ovos, sua secagem foi lenta (devido seu caráter viscoso). O maior tempo demandado para sua completa secagem pode ter

aumentado a umidade na superfície do ovo, o que de acordo como Humphrey et al.³³, pode favorecer o processo de penetração de microrganismos através da casca.

As frequências de isolamento de *Salmonella* Heidelberg em amostras de fígado, baço, fezes e saco da gema encontram-se descritas na Tabela 4.

TABELA 4 – Frequência de isolamento de *Salmonella* Heidelberg em amostras de fígado, baço, fezes e saco da gema de pintos aos 10 dias de idade de cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | Fígado (%) | Baço (%) | Fezes (%) | Saco da gema (%) |
|--------------|------------|----------|-----------|------------------|
| CN | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EJ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SH | 100,0 | 100,0 | 71,4 | 71,4 |
| SH + EJ | 80,0 | 80,0 | 40,0 | 60,0 |
| P valor** | 0,0065 | 0,0065 | 0,1395 | 0,1499 |

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

**Teste do qui-quadrado de Pearson

Aos 10 dias de idade, nota-se que as frequências do isolamento de *Salmonella* no fígado e baço das aves que receberam o extrato etanólico de jabuticaba na casca (SH + EJ) foi menor (P=0,0065) quando comparada às do grupo apenas inoculado com a bactéria (SH), o que indica um provável efeito antimicrobiano do extrato utilizado.

Estudos já relataram a atividade antimicrobiana de diferentes partes de *M. cauliflora*. Macedo-Costa et al.³⁴ observaram a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico das folhas sobre cepas de *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguini*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *Lactobacillus casei*. Também Hacke et al.³⁵ verificaram que extrato bruto liofilizado das sementes inibiu o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana observada deve-se aos compostos fenólicos existentes na jabuticaba, como os elagitaninos e o seu derivado, o ácido elágico, que atuam sobre a integridade da membrana celular bacteriana e sobre enzimas e íons metálicos necessários ao metabolismo do microrganismo³⁶⁻³⁸.

Aos 10 dias de idade foram coletadas amostras de sangue para a determinação dos perfis bioquímico sanguíneo e hematológico (Tabelas 5, 6, 7 e 8).

TABELA 5 – Valores de ácido úrico (AU), creatinina (CREA), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamyl transferase (GGT) de cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | AU (mg/dL) | CREA (mg/dL) | AST (UI/L) | GGT (UI/L) |
|--------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------|
| CN | 10,38 ^{ab} | 0,17 ^b | 165,13 ^b | 11,11 |
| EJ | 6,02 ^c | 0,24 ^{ab} | 145,04 ^b | 11,04 |
| SH | 12,73 ^a | 0,21 ^{ab} | 203,51 ^a | 13,22 |
| SH + EJ | 13,98 ^a | 0,31 ^a | 205,85 ^a | 12,11 |
| CV(%) | 37,61 | 27,32 | 11,95 | 29,83 |
| P valor | 0,0085 | 0,0246 | <0,001 | 0,63 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Os níveis séricos de ácido úrico, creatinina, AST e GGT encontrados em todos os tratamentos estão dentro da normalidade para aves sadias³⁹⁻⁴². Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Alezando et al.⁴¹, que não detectaram qualquer alteração nos níveis de creatinina e ureia de ratos alimentados com os frutos da jabuticaba por 40 dias.

Conforme descrito na Tabela 5, a aplicação do extrato na casca reduziu a quantidade de ácido úrico plasmático, quando comparado aos demais tratamentos. Segundo Hochleithner⁴⁰, Capitelli e Costa⁴⁴, reduções no ácido úrico sérico são raros e geralmente estão relacionados às lesões hepáticas severas que interferem na produção do ácido úrico, já que a maior parte deste metabólito é sintetizado pelo fígado. No entanto, não houve indícios de lesão hepática, pois os níveis de creatinina e AST encontrados em todos os tratamentos foram considerados normais.

Mesmo apresentando-se normais, a média dos valores séricos de AST detectados nas aves dos tratamentos inoculados (SH e SH + EJ), foram significativamente superiores aos demais tratamentos ($P < 0,05$). Este dado sugere que a inoculação com *Salmonella* Heidelberg não provocou danos suficientes para promover lesão hepática detectável pelos testes bioquímicos, porém produziu algum efeito deletério nos hepatócitos⁴⁵.

Os valores séricos de creatinina também apresentaram-se aumentados nas aves que receberam a inoculação e o extrato vegetal na casca (SH + EJ), mas ainda se mantiveram dentro dos padrões considerados normais para a espécie. Nas aves, a creatinina tem pouco valor diagnóstico, uma vez que seu precursor, a creatina, é excretada pelos rins antes de se transformar em creatinina⁴⁶.

TABELA 6 - Valores de proteínas totais (PROT), albumina (ALB), globulina (GLOB) e colesterol total (COL) de cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | PROT (g/dL) | ALB (g/dL) | GLOB (g/dL) | COL (g/dL) |
|--------------|----------------|---------------|--------------------|---------------------|
| CN | 3,36 | 1,81 | 1,44 ^c | 187,35 ^b |
| EJ | 3,41 | 1,76 | 1,55 ^{bc} | 149,70 ^c |
| SH | 3,62 | 1,91 | 1,77 ^b | 189,30 ^b |
| SH + EJ | 3,85 | 1,78 | 2,22 ^a | 236,02 ^a |
| CV(%) | 10,05 | 16,53 | 7,99 | 12,96 |
| <i>P</i> | 0,1041 | 0,8075 | <0,001 | <0,001 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Observa-se na Tabela 6 que os valores de proteínas séricas totais situaram-se entre 3,36 – 3,85 g/dL e, portanto, encontram-se dentro da normalidade para a espécie⁴⁶. Os valores de albumina também não sofreram qualquer alteração causada pela inoculação com *Salmonella* ou pela adição do extrato ($P > 0,05$).

Os valores médios de globulina detectados foram superiores no grupo que recebeu a bactéria e o extrato na casca (SH + EJ) ($P < 0,05$). Isto indica a ocorrência de uma resposta imune contra a bactéria inoculada, já que as imunoglobulinas (fração do grupo das globulinas) são produzidas pelos plasmócitos durante o processo infeccioso e são fundamentais para reduzir a invasão e colonização do intestino e órgãos extra-intestinais por *Salmonella*^{47,48}.

A resposta imune pode ter sido potencializada pela presença do extrato, visto que as aves que receberam o extrato juntamente com a inoculação (SH + EJ) obtiveram níveis médios de globulina superiores aos apresentados pelas aves que somente receberam a bactéria (SH). A menor frequência de isolamento de *Salmonella* no fígado e baço das aves deste grupo (Tabela 4) indica que o incremento da resposta imunológica promovido pela adição do extrato na casca foi eficaz para controlar o patógeno após a eclosão das aves. Esta afirmação encontra respaldo em Abuelsaad et al.⁴⁹ que em seu estudo observaram que o ácido elágico foi capaz de aumentar os níveis de IgM anti-LPS no soro sanguíneo de ratos infectados com *Aeromonas hydrophyla*.

Neste trabalho, os níveis plasmáticos de colesterol total detectados apresentaram-se normais para a espécie⁴⁶. Entretanto, as aves que receberam somente o extrato via casca obtiveram valores médios de colesterol inferiores aos demais tratamentos ($P < 0,05$). Resultado semelhante foi relatado por Alezandro et al.⁴³ que detectaram menores valores de colesterol

total em ratos alimentados com cascas de jabuticaba liofilizadas. Segundo os autores, a redução do colesterol se deve a inibição da lipase pancreática, demonstrada *in vitro* em seu estudo.

Situação inversa foi observada nas aves do grupo que recebeu o extrato juntamente com a inoculação, nas quais houve aumento dos níveis do colesterol total ($P < 0,05$). O fígado sintetiza ácidos biliares a partir do colesterol⁵⁰, portanto, uma maior quantidade desta gordura no soro pode indicar uma incapacidade dos hepatócitos em realizar essa síntese. Desse modo, a inoculação juntamente com a adição do extrato pode ter causado algum grau de lesão hepática, mesmo não sendo detectada pelas análises bioquímicas do soro sanguíneo.

TABELA 7 – Valores de contagem de hemácias (Hm), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | Hm (milhões/uL) | Hb (g/dL) | Ht (%) | VCM (fL) | HCM (pg) | CHCM (%) |
|--------------|--------------------|--------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| CN | 2,25 | 6,94 | 30,33 ^{ab} | 136,57 | 30,14 | 22,13 |
| EJ | 2,23 | 6,56 | 28,29 ^b | 128,04 | 29,77 | 23,22 |
| SH | 2,26 | 7,12 | 32,14 ^a | 143,06 | 31,79 | 22,12 |
| SH + EJ | 2,26 | 7,07 | 31,60 ^{ab} | 140,14 | 31,35 | 22,4 |
| CV(%) | 8,05 | 9,92 | 7,18 | 12,71 | 14,66 | 5,38 |
| <i>P</i> | 0,9961 | 0,4456 | 0,019 | 0,4303 | 0,8209 | 0,3063 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

As aves que receberam somente o extrato etanólico na casca apresentaram valor de hematócrito inferior aos demais tratamentos. O hematócrito expressa a proporção do volume da parte corpuscular no sangue, tornando um indicador de anemia, caso esteja abaixo de limite, ou desidratação, se houver um aumento em seu valor⁵¹. Em aves clinicamente saudáveis, o hematócrito pode variar entre 30,6 – 37%⁵², desse modo, este resultado pode indicar que algum componente presente no extrato tenha provocado algum dano aos eritrócitos. Esta afirmação encontra respaldo em Kawai et al.⁵³ e Scalbert et al.⁵⁴, que demonstraram que alguns fitoquímicos presentes em vegetais, como as saponinas e taninos podem provocar hemólise e precipitação de proteínas.

CONCLUSÃO

A utilização da forma líquida do extrato etanólico de cascas e sementes de *M. cauliflora* no controle de *Salmonella* Heidelberg em casca de ovos férteis não é viável devido à intensa mortalidade embrionária que promove. Nos pintos de 10 dias de idade, o extrato vegetal reduz a colonização de órgãos pela bactéria inoculada, entretanto teve efeito negativo sobre o hematócrito.

REFERÊNCIAS

1. Gast RK. Paratyphoid infection. In: Calnek BW. Diseases of Poultry, 11^a Ed. Ames: Iowa University Press, 2003. p. 97-1 21.
2. Pradhan AK, Li Y, Swem BL, Mauromoustakos A. Predictive model for the survival, death, and growth of *Salmonella* Typhimurium in broiler hatchery. *Poult Sci.* 2005;84:1959-66.
3. Nisar M, Kassem II, Rajashekara G, Goyal SM, Lauer D, Voss S, Nagajara KV. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern United States. *J Vet Diagn Invest.* 2017;29(3):370-5.
4. Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I, Farah SMSS, Abrahão WSM, Rodrigues DP. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci.* 2010;32(1):9-15.
5. Burt CR, Proudfoot JC, Roberts M, Horowitz RH. Fatal myocarditis secondary to *Salmonella* septicaemia in a young adult. *J Emerg Med.* 1990;8:295-7.
6. Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ. Invasive *Salmonella* infections in the United States, Food- Net, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis.* 2004;38:S149-56.
7. Cony HC, Vieira SL, Berres J, Gomes HA, Coneglian JLB, Freitas DM. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. *Ciênc Rural.* 2008;38(5):1407-12.
8. Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3^a Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2007.
9. Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Myrtales medicinais. In: Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2^a Ed. São Paulo: Editora UNESP; 2002. p. 321-30.
10. Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17: 114-140.
11. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18: 472-508.
12. Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chem.* 2008;109(4):883-90.
13. Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int.* 2011;44(5):1150-60.

14. Wu SB, Dastmalchi K, Long C, Kennelly EJ. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. *J Agric Food Chem.* 2012;60(30):7513–25.
15. Borges LL, Conceição EC, Silveira D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. *Food Chem.* 2014;153:224–33.
16. Haminiuk CWI, Plata-Oviedo MSV, Guedes AR, Stafussa AP, Bona E, Carpes TS. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. *Int J Food Sci Tech.* 2011;46:1529-37.
17. Baldin JC, Michelin EC, Polizer YJ, Rodrigues I, De Godoy SHS, Fregonesi RP, Pires RA, Carvalho LT, Fávaro-Trindade CS, De Lima CG, Fernandes AM, Trindade MA. Microencapsulated jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. *Meat Sci.* 2016;118:15-21.
18. Athanasiadou S, Kyriazakis I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proc Nutr Soc.* 2004;63:631-9.
19. Harborne JB. An overview of antinutritional factors in higher plants. In: Caygill JC, Mueller-Harvey I. (editores). *Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding.* Nottingham: Nottingham University, 1999. p.7-16.
20. Fernández A, Lara C, Loste A, Calvo S, Marca MC. Control of of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2001; 24: 207-16.
21. List PH, Schmidt T. *Phytopharmaceutical Technology.* Florida, USA: CRC Press; 2000.
22. Moreira JS. Extrato padronizado de jaboticaba na alimentação de frangos e poedeiras comerciais [Tese]. Goiânia – GO: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2017.
23. French N. The egg takes control- the future of the turkey incubation? Technical Article - British United Turkey. 2005:1 -5.
24. Georgia Poultry Laboratory. Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p.
25. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT, Euclides RF. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.* 3.ed. Viçosa: EdUFV, 2011, p. 252.
26. Natt MP, Herrick CA. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult Sci.* 1952;31:735-8.
27. Santos LC. *Laboratório Ambiental.* 2ed. Cascavel: Ediunioeste, 2011, p. 404.

28. Goldenfarb PB, Bowyer FP, Hall E, Brosius E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am J Clin Pathol.* 1971;56:35-9.
29. Wintrobe MM. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.* 1934;51:32-49.
30. The R Project for Statistical Computer, Version 3.2.2, 2015.
31. Christensen VL. Factors affecting hatchability of turkey embryos. *Poult Avian Biol Rev.* 1995;6(1):71-82.
32. Raghianti F, Rocha TS, Rossi DA, Silva PL. Penetration time of *Salmonella* Heidelberg through shells of white and brown commercial eggs. *Braz J Poult Sci.* 2010;12(4):273-7.
33. Humphrey TJ. Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. In: Saeed AM, editors. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in humans and animals: Epidemiology, pathogenesis, and control. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1999.p. 183–91.
34. Macedo-Costa MR, Diniz DN, Carvalho CM, Pereira MSV, Pereira JV, Higino JS. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;19(2B):565-71.
35. Hacke ACM, Granato D, Maciel LG, Los Weinert P, Do Prado-Silva L, Alvarenga VO, Sant’Ana AS, Bataglion GA, Eberlin MN, Rosso ND. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds: chemical characterization and extraction of antioxidant and antimicrobial compounds. *J Food Sci.* 2016;81(9):C2206-17.
36. Uni Z, Tako E, Gal-Garber O, Sklan D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. *Poult Sci.* 2003;82:1747-54.
37. Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;48:487-91.
38. Li N, Lou M, Fu Y, Zu YG, Wang W, Zhang L, Yao L, Zhao C, Sun Y. Effect of corilagin on membrane permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Phytother Res.* 2013;27:1517-23.
39. Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int J Food Microbiol.* 2010;140:175-82.
40. Hochleithner M. Biochemistries In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. *Avian medicine: principles and application.*[online] Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p. 176-198.
41. Borsa A, Kohayagawa A, Boretti LP, Saito ME, Kuibida K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58(4):675-7.

42. Thrall MA. Hematologia e bioquímica química veterinária. São Paulo. ROCA. 2006; 582p.
43. Alezandro MR, Granato D, Genovese MI. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. *Food Res Int.* 2013;54:650-9.
44. Capitelli R, Crosta L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2013; 16 (1): 71–120.
45. Cho JH, Kim HJ, Kim IH. Effects of phytogetic feed additive on growth performance, digestibility, blood metabolites, intestinal microbiota, meat color and relative organ weight after oral challenge with *Clostridium perfringens* in broilers. *Livest Sci.* 2014;160:82-8.
46. Campbell TW. Clinical Chemistry of Birds. In: Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicola D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* Philadelphia: Lippincott: Williams & Wilkins; 2004. p 479-491.
47. Mastroeni P, Chabacagoity SJ, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. *Vet J.* 2001; 161 (2): 132-164.
48. Mittrücker HA , Raupach B , Köhler A, Kaufmann SHE. Cutting Edge: Role of B Lymphocytes in Protective Immunity Against *Salmonella typhimurium* Infection. *J Immunol.* 2000; 164 (4): 1648-1652.
49. Abuelsaad ASA, Mohamed I, Allam G, Al-Solumani AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagi acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *Life Sci.* 2013;714-22.
50. McDonald P, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Edward R, Sinclair L, Wilkison R. *Animal nutrition.* 7^a Ed. Pearson Canada. 2010; 712p.
51. Carrijo AS, Madeira LA, Sartori JR, Pezzato AC, Gonçalves JC, Cruz VC, Kuibida KV, Pinheiro DF. Alho em pó na alimentação alternativa de frangos de corte. *Pesq Agropec Bras.* 2005; 40(7) : 673-9.
52. Cardoso ALSP, Tessari ENC. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. *Arq Inst Biol.* 2003; 70(4): 419-424.
53. Kawai H, Kuroyanagi M, Umehara K, Ueno A, Satake M. Studies on the saponins of *Lonicera japonica*. *Chem Pharm Bull.* 1988;36:4769–75.
54. Scalbert A. Quantitative Methods for the Estimation of Tannins in Plant Tissues. In: Hemingway RW, Laks PE, editors. *New York: Plenum Press; 1992.p.259–80.*

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) COMO ADITIVO ALIMENTAR EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *Salmonella* HEIDELBERG

RESUMO: Objetivou-se com este estudo investigar os efeitos da suplementação do extrato etanólico de cascas e sementes de *Myrciaria cauliflora* sobre o desempenho e características intestinais de frangos de corte inoculados com *Salmonella* Heidelberg e criados até os 28 dias de idade. Foram utilizados 336 pintos machos de um dia de idade distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso em quatro tratamentos com sete repetições cada: CN – grupo controle negativo, que recebeu solução salina esterilizada a 0,85% via ingluvívio; EJ – grupo que recebeu apenas o extrato vegetal na ração; SH – grupo que recebeu o inóculo bacteriano via ingluvívio; e SH + EJ – grupo que recebeu o inóculo bacteriano via ingluvívio e o extrato vegetal na ração. A suplementação com o extrato vegetal não influenciou as variáveis de desempenho e aumentou a excreção de *Salmonella* nas aves inoculadas aos 11 e 28 dias de idade. *Salmonella* reduziu a altura das vilosidades jejunais aos 28 dias. Conclui-se que a utilização do extrato etanólico de jabuticaba não afeta o ganho de peso, conversão alimentar, peso médio, altura de criptas e vilosidades e peso intestinal, entretanto aumenta a excreção de *Salmonella* Heidelberg.

Palavras-chave: excreção, fitogênicos, ganho de peso, histomorfometria, salmonelose.

CHAPTER 4 - EFFECTS OF ETHANOLIC EXTRACT OF JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) AS FOOD ADDITIVE IN BROILER CHICKENS EXPERIMENTALLY INOCULATED WITH *Salmonella* HEIDELBERG

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of ethanolic extract of peels and seeds by *Myrciaria cauliflora* supplementation in performance and intestinal health of broilers inoculated with *Salmonella* Heidelberg and reared until 28 days of age. 336 one-day-old male chicks distributed in a completely randomized design with four treatments each and seven replications: CN - negative control, which received sterilized saline solution at 0.85% in crop; EJ - group that fed only with vegetal extract; SH - group that received the inoculum bacterial in crop; and SH + EJ - group that received bacterial inoculum in crop and fed with herbal extract in the diet. The supplementation with herbal extract did not influence the performance and increased the *Salmonella* excretion in inoculated birds with 11 and 28 days of age. *Salmonella* reduced the jejunal villi height at 28 days. It is concluded that use of ethanolic extract of jabuticaba does not affect the weight gain, feed conversion, average weight, histomorphometry and intestinal biometry, but it increases of *Salmonella* Heidelberg excretion.

Keywords: excretion, histomorphometry, phytogetic, salmonellosis, weight gain.

INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas foram empregados diversos aditivos na dieta de frangos de corte com o intuito de aumentar os índices zootécnicos. Estas suplementações incluíam a adição de baixas dosagens de antibióticos como melhoradores de crescimento, que resultaram em mudanças consideráveis na microbiota intestinal e, conseqüentemente, no aumento do ganho de peso e eficiência alimentar das aves. Entretanto, a proibição do uso destes aditivos pela União Europeia (Regulamento CE nº 1831/2003) prejudicou o desenvolvimento dos animais e aumentou a frequência de patologias entéricas¹⁻⁴.

Neste contexto, tornou-se fundamental a busca por novos aditivos que venham substituir satisfatoriamente os antibióticos melhoradores de desempenho. Dentre essas alternativas, destacam-se os aditivos fitogênicos, que são compostos derivados de plantas que são adicionados à dieta dos animais. O principal benefício da suplementação dos animais com os fitogênicos envolve os impactos positivos que podem causar em sua saúde, agindo na microbiota intestinal controlando o crescimento de microrganismos patogênicos, diminuindo a produção de amônia, proporcionando maior produção de muco no intestino e melhorando a capacidade digestiva do animal⁵⁻⁷.

Myrciaria cauliflora (Mart) O. Berg é uma espécie arbórea de pequeno porte da família Myrtaceae. Está amplamente disseminada na América do Sul, principalmente no Brasil, onde é conhecida popularmente como jabuticaba paulista ou açu. Análises fitoquímicas nos frutos detectaram a presença de compostos voláteis, antocianinas e flavonoides⁸⁻¹⁰. Elagitaninos como strictinina, casuarina, pedunculagina, vescalagina e castalagina, entre outros também foram identificados^{10,11} e possuem diversas propriedades biológicas. Alguns estudos realizados com diversas partes da espécie apontaram potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos^{12,13}.

Os elagitaninos, um dos principais fitoquímicos presentes na jabuticaba, podem modular a microbiota intestinal, aumentando a população de lactobacilos e bifidobactérias, que são grupos bacterianos associados a vários efeitos benéficos à saúde, nos níveis celulares e sistêmicos. Além disso, ao estimular o crescimento de bactérias benéficas, os elagitaninos inibem o estabelecimento de microrganismos potencialmente patogênicos no lúmen intestinal¹⁴.

Mesmo com a grande variedade de compostos de interesse farmacológico existentes nos resíduos de jabuticaba, são escassos os estudos sobre sua atividade antimicrobiana sobre microrganismos patogênicos. Dentre os patógenos de caráter zoonótico de grande importância

para a saúde pública, destacam-se os sorovares paratífóides pertencentes ao gênero *Salmonella*, que são conhecidos mundialmente por serem os principais agentes responsáveis por doenças transmitidas por alimentos ao homem¹⁵. No Brasil, *Salmonella* Heidelberg foi identificado como um dos sorovares frequentemente isolado em surtos de intoxicação alimentar pelo consumo de ovos e produtos à base de carne de frango, e atualmente, é considerado um sorovar emergente, sendo o terceiro mais isolado em granjas comerciais¹⁵⁻¹⁷.

Diante disso, objetivou-se com este trabalho avaliar a inclusão do extrato etanólico do resíduo industrial de jabuticaba na ração sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Heidelberg.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG).

O protocolo experimental utilizado nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA – UFG sob o n° 107/2015.

Delineamento experimental

No experimento foram utilizados 336 pintos de corte de um dia de idade, machos da linhagem Cobb 500, os quais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em quatro tratamentos com sete repetições cada e alojados, até os 28 dias de idade, em grupos de 12 aves por unidade experimental. As aves foram pesadas e alojadas conforme o seguinte delineamento: T1 - consistiu o grupo controle negativo (CN); T2 – recebeu apenas o extrato etanólico de jabuticaba na ração (EJ); T3 – recebeu o inóculo com *Salmonella* Heidelberg via ingluvívio (SH); T4 – recebeu o inóculo com *Salmonella* Heidelberg via ingluvívio e extrato etanólico na ração (SH + EJ).

As aves inoculadas e não inoculadas foram mantidas em alojamentos separados, em baterias de aço galvanizado com quatro andares, equipadas com comedouros e bebedouros do tipo lineares e bandejas para retirada de excretas, mantendo-se a mesma ambiência entre eles. As baterias foram aquecidas com lâmpadas incandescentes (uma por andar) de 60 W até os 14 dias de idade.

Preparação do inóculo e inoculação das aves

O inóculo foi elaborado com *Salmonella* Heidelberg isolada de amostras provenientes de frangos de corte e concedida pelo Laboratório de Bacteriologia, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e tipificada pelo Laboratório FIOCRUZ-RJ.

A cepa foi repicada em ágar verde brilhante e posteriormente mantida em temperatura de incubação de 37°C por 24 horas. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, armazenada a 4°C. A concentração de $4,6 \times 10^7$ UFC/mL foi ajustada com auxílio da escala Mac Farland e confirmada por plaqueamento das diluições seriadas em ágar MacConkey, com posterior incubação a 37°C por 24 horas e contagem das

Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Salmonella* Heidelberg, conforme metodologia proposta por Fernández et al¹⁸.

A inoculação das aves foi realizada com um dia de idade, antes do alojamento. Com auxílio de um pipetador automático, cada ave recebeu 0,3 mL de solução salina tamponada a 0,85% via oral, contendo aproximadamente $4,6 \times 10^7$ UFC/mL.

Obtenção do extrato etanólico de cascas e sementes *M. cauliflora*

O extrato líquido padronizado em compostos fenólicos da jabuticaba foi processado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia – UFG. O resíduo utilizado nessa pesquisa foi o subproduto da produção de fermentado de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O Berg.], composto basicamente de sementes e cascas dos frutos, gentilmente cedidos pela Vinícola Jabuticabal, situada no município de Hidrolândia/GO (16° 55' 32.35" S 49° 21' 39.76" W). O resíduo foi dessecado a 40 °C em estufa com circulação de ar. Em seguida, a amostra foi moída em moinho de facas com tamis número 100 (150 µm) e o pó resultante do material vegetal devidamente acondicionado em sacos plásticos e armazenados a uma temperatura de -10°C.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação empregando como solvente álcool a 45% (v/v). O processo extrativo foi constituído por três etapas: 1 - pré-intumescimento: durante um intervalo de 2 h com a proporção de 1 Kg do material vegetal com 3 L da mistura hidroalcoólica; 2 – repouso: a mistura anteriormente preparada foi deixada em repouso durante 24 h, fase conhecida como maceração intermediária; 3 – empacotamento: transferência do material anterior para um percolador de 10 L, completando o volume com a mesma mistura hidroalcoólica e percolação com um fluxo de aproximadamente 0,2 mL/min¹⁹.

Análises anteriores realizadas por Moreira²⁰ revelaram que o extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba utilizado no presente estudo apresentou 14,26% de fenóis totais, 5,12% de taninos, 28,23% de flavonoides, 2,10% de proteína e 1,75% de extrato etéreo, além de ácidos graxos saturados mirístico (0,52%), palmítico (26,65%) e esteárico (2,92%); monoinsaturados palmitoléico (1,22%) e oléico (11,12%); e poli-insaturados linoléico (39,15%) e linolênico (8,21%). A concentração do ácido elágico foi determinada pelo método de cromatografia de alta eficiência (CLAE), que indicou $130,02 \pm 0,62$ µg/mL do extrato.

Programa alimentar

O programa alimentar foi constituído por três rações experimentais diferentes: pré-inicial (1 – 7 dias), inicial (8 – 21 dias) e crescimento (22 – 28 dias), formuladas de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais propostas pelas Rostagno et al.²¹ (Tabela 1).

Todas as rações utilizadas durante o experimento foram à base de milho moído e farelo de soja, sem adição de promotores de crescimento. O extrato etanólico líquido das cascas e sementes de jabuticaba foi adicionado à ração em substituição ao inerte (amido) na dosagem de 600 mg/kg de ração. Durante todo o período experimental, as aves receberam alimentação e água *ad libitum*.

TABELA 1 – Composição percentual das rações experimentais fornecidas às aves durante o período experimental (1 - 28 dias de idade)

| Ingredientes (g/kg) | Pré-inicial (1-7 dias) | Inicial (8-21 dias) | Crescimento (22-28 dias) |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Milho grão | 554,00 | 574,20 | 623,00 |
| Farelo de soja (45%) | 381,70 | 351,70 | 313,40 |
| Óleo de soja | 20,80 | 27,40 | 29,90 |
| Calcário | 9,40 | 10,00 | 5,10 |
| Fosfato bicálcico | 19,00 | 24,60 | 17,10 |
| Sal comum | 5,00 | 4,50 | 4,20 |
| L-treonina | 1,10 | 0,60 | 0,30 |
| L-lisina HCL | 2,90 | 2,00 | 2,00 |
| DL-metionina | 3,60 | 2,40 | 2,40 |
| Premix vitamínico* | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Premix mineral** | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Inerte (amido) | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Nutrientes | | | |
| Energia metabolizável (kcal/kg) | 2.950 | 3.000 | 3.100 |
| Proteína bruta (%) | 22,20 | 20,80 | 19,50 |
| Cálcio (%) | 0,92 | 1,11 | 0,73 |
| Fósforo disponível (%) | 0,47 | 0,40 | 0,34 |
| Sódio (%) | 0,22 | 0,21 | 0,20 |
| Lisina (%) | 1,31 | 1,28 | 1,08 |
| Metionina + cistina (%) | 0,94 | 0,81 | 0,79 |
| Metionina (%) | 0,65 | 0,54 | 0,52 |

* Suplemento vitamínico (níveis de garantia por kg do produto): vit. A, 1.680.000 UI; vit.D 3, 400.000 UI; vit. E, 3500 mg; vit. K, 360 mg; vit. B1, 436,50 mg; vit. B2, 1.200 mg; vit. B6, 624 mg; vit. B12, 2.400mcg; ác. Fólico, 200 mg; ác. pantotênico, 3.120 mg; niacina, 8.400 mg; biotina, 10.000 mcg.

** Suplemento mineral (níveis de garantia por kg do produto): zinco, 17.500 ppm; ferro, 12.500 ppm; cobre, 2.000 ppm; iodo, 187,50 ppm; selênio, 75 ppm.

Desempenho

As pesagens das aves, assim como das rações, aconteceram semanalmente até os 28 dias de idade para cálculo de consumo de ração, peso médio, ganho de peso e conversão

alimentar. As aves mortas foram identificadas e pesadas para o ajuste do consumo de ração e conversão alimentar, bem como necropsiadas e as alterações macroscópicas detectadas.

Para análise do desempenho das aves foi observado o seguinte:

- Peso Médio (PM): obtido dividindo-se o peso total das aves de cada parcela, pelo número total de aves da parcela, $PM=PF/NMA$;
- Ganho de Peso (GP): calculado pela diferença entre o peso final e o peso inicial das aves somado ao peso da ave morta e dividindo pelo número médio de aves, $GP= [(PF-PI) + \text{Peso da ave morta}]/NMA$;
- Consumo de ração (CR): calculado pela razão entre o consumo de ração total (fornecido – sobra) e o número total de aves;
- Conversão alimentar (CA): calculada pela razão: CR/PM ;

Histomorfometria intestinal

Aos 11 e 28 dias, as aves foram previamente submetidas a jejum alimentar de oito horas, das quais um indivíduo por parcela, totalizando sete por tratamento, foram insensibilizados por inalação de CO₂ para posterior sangria através da secção da artéria femoral. Fragmentos do duodeno (retirados na flexura do pâncreas) e do jejuno (retirados antes do divertículo de Meckel) foram coletados e abertos longitudinalmente, e as extremidades fixadas com grampo em placa de isopor. Cada peça foi acondicionada em frascos, previamente identificados, contendo formol tamponado a 10% para confecção de lâminas histológicas. Após serem corados pela hematoxilina eosina (HE), foram submetidos à análise de histomorfometria com medição de altura de vilosidade e profundidade de cripta utilizando o programa *Image J*® versão 1.45²².

A altura do vilão foi determinada utilizando o ápice do vilão até a base da junção do vilão com a cripta e a profundidade da cripta foi definida com a profundidade da invaginação da cripta com os vilos adjacentes. Foram realizadas trinta leituras por lâmina para altura do vilão e trinta leituras em sequência para profundidade das criptas por fragmento de cada tecido, sempre da direita para a esquerda do corte, totalizando 180 leituras por tratamento. As imagens foram digitalizadas em microscópio óptico marca Leica modelo DM 4000 B acoplado a um microcomputador.

Pesquisa de *Salmonella* em excretas

Aos 11, 21 e 28 dias de idade foram coletadas excretas frescas presentes nas bandejas das baterias. As amostras foram armazenadas em recipientes esterilizados e destinados à análise bacteriológica.

De cada amostra de excretas foram pesados 25 g, que foram transferidos para sacos plásticos estéreis do tipo Stomacher® contendo 225 mL de solução peptonada a 1% e incubadas a 37°C/18-20h. Após esse período, foram homogeneizadas e 1 mL foi transferido para 9 mL de caldo Selenito Cistina (CS) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) seguindo-se a incubação a 37°C/24h.

Após esse período, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas foram plaqueadas por esgotamento em superfície para os ágaros: Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4), Hektoen e Verde Brilhante, e novamente incubado a 37°C/24h. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com características morfológicas de *Salmonella* foram selecionadas e três a cinco UFC por placa foram transferidas para tubos contendo Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e incubados a 37°C/24h. As culturas em TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidas ao teste de urease, produção de indol, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato de Simons. Quando as provas bioquímicas eram compatíveis com *Salmonella*, as amostras foram submetidas ao teste sorológico com soro polivalente anti-O e as positivas foram encaminhadas à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)-RJ em ágar nutriente para tipagem sorológica.

Contagem de células caliciformes

As amostras de duodeno e jejuno foram processadas e coradas com *Alcian Blue* para a contagem das células caliciformes. As imagens da mucosa intestinal foram obtidas em microscópio óptico marca Leica modelo DM 4000 B acoplado a um microcomputador. De cada lâmina analisou-se seis campos por fragmento intestinal em aumento de 10x. As imagens foram segmentadas por *threshold* no programa *Image J*® versão 1.45²² no qual as áreas marcadas para as células caliciformes ficaram negras, que foram posteriormente quantificadas pelo *software*.

Análise Estatística

Os dados quantitativos de desempenho animal, histomorfometria e contagem de células caliciformes foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas com o teste de Tukey a 5%. A comparação entre o percentual de positividade de *Salmonella* nas

excretas das aves foi feita utilizando o teste qui-quadrado de Pearson, com nível de significância de 5%. No tratamento estatístico dos dados foi utilizado o *software* R, versão 3.2.2²⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão expostos os resultados do desempenho semanal das aves submetidas aos tratamentos experimentais.

TABELA 2 – Peso médio inicial (PMI), peso médio final (PMF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), níveis de significância (*P*) e coeficiente de variação (CV) observados nos tratamentos experimentais para a avaliação dos resultados de desempenho

| Variáveis | Tratamentos* | | | | | CV(%) | P |
|-------------|--------------|--------|--------|---------|--------|-------|--------|
| | CN | EJ | SH | SH + EJ | | | |
| 1 - 7 dias | PMI (g) | 41,8 | 41,8 | 41,9 | 42,0 | 0,53 | 0,4573 |
| | PMF (g) | 129,4 | 127,9 | 134,7 | 133,9 | 4,67 | 0,1486 |
| | GPM (g) | 87,6 | 86,2 | 92,9 | 91,8 | 6,86 | 0,1649 |
| | CR (g) | 85,2 | 86,0 | 89,9 | 85,2 | 7,83 | 0,6242 |
| | CA (g/g) | 1,00 | 1,00 | 0,96 | 0,93 | 5,93 | 0,2100 |
| 1 - 14 dias | PMF (g) | 364,8 | 363,5 | 375,1 | 385,6 | 4,54 | 0,0855 |
| | GPM (g) | 322,9 | 321,7 | 333,1 | 343,4 | 5,13 | 0,0938 |
| | CR (g) | 428,8 | 422,2 | 432,3 | 436,8 | 4,04 | 0,4824 |
| | CA (g/g) | 1,32 | 1,33 | 1,29 | 1,30 | 4,77 | 0,5400 |
| 1 - 21 dias | PMF (g) | 769,6 | 757,6 | 763,9 | 733,4 | 4,41 | 0,2163 |
| | GPM (g) | 727,8 | 715,8 | 725,8 | 691,2 | 4,53 | 0,1599 |
| | CR (g) | 1018,6 | 1012,1 | 993,4 | 970,4 | 4,30 | 0,1785 |
| | CA (g/g) | 1,39 | 1,38 | 1,39 | 1,40 | 3,87 | 0,9100 |
| 1 - 28 dias | PMF (g) | 1172,3 | 1178,4 | 1162,4 | 1171,0 | 4,76 | 0,9608 |
| | GPM (g) | 1130,5 | 1136,6 | 1120,5 | 1128,9 | 4,93 | 0,9598 |
| | CR (g) | 1747,1 | 1732,9 | 1734,5 | 1756,9 | 4,01 | 0,9066 |
| | CA (g/g) | 1,51 | 1,52 | 1,54 | 1,56 | 4,57 | 0,5900 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Conforme observado na Tabela 2, não houve qualquer influência da inoculação com *Salmonella* ou da suplementação com o extrato vegetal ($P > 0,05$) sobre as variáveis de desempenho em todos os períodos analisados. Os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com os encontrados por Moreira²⁰, que utilizaram a mesma quantidade de extrato etanólico de jabuticaba (600 mg/kg de ração) e também não detectaram efeitos do produto sobre o desempenho de frangos de corte até os 21 dias de idade.

A inoculação com *Salmonella* Heidelberg também não afetou o desempenho das aves nas idades avaliadas ($P > 0,05$). Resultado semelhante foi relatado por Amerah et al.²⁵, Martins²⁶ e Lourenço²⁷ que também não observaram efeitos da inoculação com *Salmonella*

Heidelberg sobre o desempenho de frangos de corte. Segundo Muniz et al.²⁸, a infecção por salmonelas paratíficas não interferem de forma significativa no desempenho zootécnico dos animais, já que esses microrganismos são capazes de conviver de forma equilibrada com o hospedeiro.

Mesmo não interferindo no desempenho das aves, *Salmonella* foi detectada nas excretas das aves inoculadas em todas as idades avaliadas (Tabela 3).

TABELA 3 – Frequência de isolamento de *Salmonella* em amostras de excretas das aves de cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | Excretas | | | | | |
|-----------------|----------|------|---------|------|---------|------|
| | 11 dias | | 21 dias | | 28 dias | |
| | (+) | % | (+) | % | (+) | % |
| CN | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 |
| EJ | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 |
| SH | 1/7 | 14,3 | 3/7 | 42,8 | 1/7 | 14,3 |
| SH + EJ | 3/7 | 42,8 | 3/7 | 42,8 | 6/7 | 85,7 |
| <i>P</i> valor* | 0,0719 | | 0,0542 | | 0,0179 | |

*Teste do qui-quadrado de Pearson

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Conforme observado na Tabela 3, não foi detectado *Salmonella* nas amostras dos grupos controle negativo e que recebeu somente o extrato, o que certifica que não houve contaminação cruzada.

Apesar de ter sido isolada nas excretas em todas as idades pesquisadas, a inoculação com *Salmonella* Heidelberg não produziu sinais clínicos ou mortalidade nas aves, o que caracteriza o estado portador inaparente. Essa particularidade, própria das salmonelas paratíficas, estabelece uma importante fonte de contaminação para toda a cadeia produtiva. A infecção de pintos recém-eclodidos com *Salmonella* por inoculação oral ou pelo contato com excreções de aves doentes pode levar ao estabelecimento de colonização intestinal que persiste até a idade adulta²⁹⁻³¹ promovendo a disseminação do agente durante períodos estressantes³².

Também verifica-se na Tabela 3 que, aos 28 dias de idade, a frequência de isolamento de *Salmonella* nas excretas apresentou diferença significativa entre os grupos ($P = 0,0179$), apresentando-se maior no grupo inoculado que recebeu o extrato etanólico na ração

(SH + EJ). Esse resultado denota que o produto vegetal utilizado intensificou a colonização intestinal pela bactéria inoculada.

Esperava-se que o extrato etanólico de jabuticaba inibisse a multiplicação de *Salmonella* por este apresentar quantidades consideráveis de compostos fenólicos, principalmente taninos e flavonoides. Esses fitoquímicos apresentam atividade antimicrobiana a partir de diversos mecanismos como inibição de enzimas microbianas, privação de substratos necessários ao crescimento microbiano, ação direta sobre o metabolismo através da inibição da fosforilação oxidativa, privação de íons ferro, promoção de agregação bacteriana – impedindo a separação das células durante a divisão binária, danos à membrana celular, dentre outros³³⁻³⁸.

Esse resultado sugere que a suplementação com o extrato promoveu um desequilíbrio na microbiota intestinal que, associada a re-infecção constante promovida pelo contato próximo das aves dentro da gaiola, provavelmente permitiu a colonização dos enterócitos por *Salmonella*. Esta afirmação encontra respaldo em Paz³⁹ e Rocha⁴⁰, que destacam que uma microbiota intestinal saudável contribui na proteção do hospedeiro por meio da exclusão competitiva, que evita o estabelecimento de patógenos entéricos.

O desequilíbrio da microbiota intestinal promovido pelo extrato vegetal também explica a menor recuperação de *Salmonella* das excretas do grupo que recebeu apenas o inóculo bacteriano (SH) na maioria das idades avaliadas, visto que a aquisição de uma microbiota intestinal diversificada a partir da primeira semana de vida da ave reduz a intensidade e duração da colonização por *Salmonella*⁴¹⁻⁴³.

Na Tabela 4, encontram-se descritos os valores médios da altura dos vilos, profundidade de cripta e relação vilo/cripta do duodeno e jejuno, aos 11 e 28 dias de idade.

Não foi observada influência do produto vegetal ($P>0,05$) na histomorfometria intestinal das aves nas idades avaliadas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Moreira²⁰, que não observou alteração no comprimento de vilos ou na profundidade das criptas intestinais de frangos de corte suplementados com o extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba.

Observa-se que aos 11 dias de idade não houve efeito da inoculação ($P>0,05$) sobre a altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo/cripta dos segmentos intestinais analisados. Entretanto, aos 28 dias de idade a presença de *Salmonella*, independente da suplementação com o extrato vegetal, reduziu a altura das vilosidades jejunais ($P<0,05$), demonstrando que o agente foi capaz de induzir destruição celular.

TABELA 4 – Alturas médias dos vilos (AV), profundidade de criptas (PC) e relação vilos/cripta (V/C) do duodeno e jejuno de frangos aos 11 e 28 dias de idade observados em cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | Duodeno | | | Jejuno | | |
|-------------------------|---------|---------|--------|----------------------|---------|--------|
| | AV (µm) | PC (µm) | V/C | AV (µm) | PC (µm) | V/C |
| 11 dias de idade | | | | | | |
| CN | 1627,74 | 319,51 | 5,28 | 736,02 | 211,92 | 3,41 |
| EJ | 1412,21 | 273,37 | 5,49 | 745,55 | 234,69 | 3,34 |
| SH | 1524,61 | 277,22 | 5,52 | 872,94 | 250,54 | 3,51 |
| SH + EJ | 1434,84 | 317,32 | 4,53 | 749,78 | 217,67 | 3,43 |
| CV (%) | 16,96 | 13,88 | 21,76 | 14,69 | 20,4 | 18,23 |
| P>F | 0,6302 | 0,3118 | 0,6041 | 0,3413 | 0,6834 | 0,985 |
| 28 dias de idade | | | | | | |
| CN | 1704,68 | 246,39 | 5,94 | 1308,51 ^a | 255,35 | 5,13 |
| EJ | 1657,7 | 259,81 | 6,59 | 1308,38 ^a | 227,76 | 5,39 |
| SH | 1673,07 | 317,77 | 5,32 | 1080,96 ^b | 204,79 | 5,23 |
| SH + EJ | 1613,14 | 342,99 | 4,81 | 1029,82 ^b | 261,31 | 3,98 |
| CV (%) | 15,49 | 16,44 | 26,86 | 9,03 | 13,95 | 15,01 |
| P>F | 0,9706 | 0,0609 | 0,4226 | 0,004 | 0,1566 | 0,0899 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Os resultados deste estudo diferem dos encontrados por Previato do Amaral et al.⁴⁴ que não detectaram qualquer influência da inoculação deste sorovar sobre a altura das vilosidades jejunais de frangos de corte criados até 21 dias de idade. Estes dados contraditórios ocorrem devido à variação da patogenicidade encontrada entre as cepas, que modificam a sua capacidade de causar a doença no hospedeiro. Esta variação se deve a expressão de determinados genes que codificam fatores de virulência que atuam favorecendo a colonização e a ocorrência de eventos que irão definir o aparecimento de lesões e sinais clínicos⁴⁵.

Identificou-se que a redução das vilosidades jejunais não interferiu no desempenho das aves inoculadas, conforme foi demonstrado na Tabela 2. Segundo Previato et al.⁴⁴ isso demonstra que a avaliação de um único parâmetro não é suficiente para demonstrar o potencial de absorção do intestino. As medidas de vilosidade são comumente utilizadas para investigar os efeitos de nutrientes na fisiologia gastrointestinal, mas a correlação entre o desempenho das aves e a histomorfometria intestinal precisa ser melhor avaliada⁴⁶.

TABELA 5 – Contagem das células caliciformes intestinais aos 11 e 28 dias de idade registradas em cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | 11 dias de idade | | 28 dias de idade | |
|--------------|------------------|----------------------|------------------|--------|
| | Duodeno | Jejuno | Duodeno | Jejuno |
| CN | 2226,3 | 2104,9 ^a | 1615,2 | 1769,0 |
| EJ | 1967,6 | 2383,7 ^a | 1787,8 | 2085,0 |
| SH | 1622,0 | 1292,9 ^b | 1727,7 | 2192,1 |
| SH + EJ | 2063,4 | 1910,4 ^{ab} | 1930,0 | 2362,3 |
| CV (%) | 28,4 | 19,7 | 15,6 | 17,7 |
| P>F | 0,5818 | 0,01 | 0,4692 | 0,1999 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

* CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Conforme apresentado na Tabela 5, as aves que receberam apenas o inóculo com *Salmonella* possuíam menor quantidade de células caliciformes no jejuno aos 11 dias de idade ($P < 0,05$). As células caliciformes são responsáveis pela produção de muco que recobre a vilosidades intestinais e atua como uma barreira de proteção contra agressões de agente físicos e microbiológicos, além de contribuírem com a resposta imune inata⁴⁷. Segundo Amit-Romach et al.⁴⁸, a diminuição da produção de muco propicia melhores condições para a multiplicação de enteropatógenos.

Entretanto, a redução das células caliciformes observada neste grupo não foi suficiente para intensificar a colonização ou destruição das vilosidades, visto que não foram verificadas diferenças significativas na excreção de *Salmonella* ou na histomorfometria intestinal nesta mesma idade, conforme apresentado nas Tabelas 3 e 4.

CONCLUSÕES

A suplementação das aves com extrato etanólico do resíduo industrial de *M. cauliflora* não afeta o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, peso médio, histomorfometria intestinal, entretanto aumenta a excreção de *Salmonella* Heidelberg nas aves inoculadas.

REFERÊNCIAS

1. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci.* 2005;84(4):634-43.
2. Niewold TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult Sci.* 2007;86(4):605-9.
3. Danzeisen JL, Kim HB, Isaacson RE, Tu ZJ, Johnson TJ. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS One.* 2011; 6, e27949.
4. Roberts T, Wilson J, Guthrie A, Cookson K, Vancraeynest D, Schaeffer J, Moody R, Clark S. New issues and science in broiler chicken intestinal health: Emerging technology and alternative interventions. *J Appl Poult Res.* 2015;24:257-66.
5. Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci.* 2007;86(14) Suppl, p. E140-8.
6. Greathead H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc Nutr Soc.* 2003; 62(2):279-90.
7. Hashemi SR, Davoodi H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications.* 2011; 35(2):169–80.
8. Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB, Kennelly EJ. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod.* 2006;69(8):1228–30.
9. Plagemann I, Krings U, Berger RG, Marostica Júnior MR. Volatile constituents of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. *J Essent Oil Res.* 2012;24(1):45–51.
10. Wu SB, Dastmalchi K, Long C, Kennelly EJ. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *J Agric Food Chem.* 2012;60(30):7513–25.
11. Pereira EPR. Avaliação microbiológica, físico-química e sensorial de *petit suisse* probiótico contendo extrato de casca de jaboticaba.[Tese]. Campina – SP: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2014.
12. Souza TM. Estudo Farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.[Dissertação]. Araraquara – SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2007.

13. Hacke ACM, Granato D, Maciel LG, Los Weinert P, Prado-Silva L, Alvarenga VO, et al. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds: chemical characterization and extraction of antioxidant and antimicrobial compounds. *J Food Sci.* 2016;81(9):C2206-17.
14. Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int J Food Microbiol.* 2010;140:175-82.
15. Silva IGO, Vellano IHB, Moraes AC, Lee IM, Alvarenga B, Milbradt EL, Hataka A, Okamoto AS, Andreatti Filho RL. Evaluation of a probiotic and a competitive exclusion product inoculated in ovo on broilers chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg. *Braz J Poult Sci.* 2017;19(1):19-26.
16. Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I, Farah SMSS, Abrahão WSM, Rodrigues DP. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci.* 2010;32(1):9-15.
17. Voss-Rech D, Vaz CSL, Alves L, Coldebella A, Leao JA, Rodrigues DD, Back A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poult Sci.* 2015;94(3):433-441.
18. Fernández A, Lara C, Loste A, Calvo S, Marca MC. Control of of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2001; 24: 207-16.
19. List PH, Schmidt T. *Phytopharmaceutical Technology.* Florida, USA: CRC Press; 2000.
20. Moreira JS. Extrato padronizado de jaboticaba na alimentação de frangos e poedeiras comerciais [Tese]. Goiânia – GO: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2017.
21. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT, Euclides RF. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.* 3.ed. Viçosa: EdUFV, 2011, p. 252.
22. Rasband WS. *ImageJ.* 2011. Version 1.41o. Bethesda: Natl. Inst. Health, USA.
23. Grieves DB. *Immunophysiology.* In: Surkie PD. *Avian Physiology,* 4 ed. Tennessee: Kingsport Press; 1991. 685p.
24. The R Foundation for Statistical Computing. Versão 3.2.2, 2015.
25. Amerah AM, Mathis G, Hofacre CL. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and *Salmonella* colonization of broiler chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg. *Poult Sci.* 2012;91:943-7.
26. Martins JCG. Ácidos orgênicos e probióticos na redução da colonização de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte. [Dissertação]. Londrina – PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos; 2015.

27. Lourenço MC. Alterações histológicas e imunológicas de frangos desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella enterica*. [Tese]. Curitiba – PR: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias; 201.
28. Muniz EC, Pickler L, Lourenço MC, Kraieski AL, Mesa D, Westphal P, Santin E. Avaliação da resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*. *Pesq Vet Bras*. 2015;35(3):241-8.
29. Gast RK, Holt PS. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella enteritidis* strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Dis*. 2000;44:706–10.
30. Nakamura M, Nagamine N, Suzuki S, M. Norimatsu, K. Oishi, M. Kijima, Y. Tamura, S. Sato. Long-term shedding of *Salmonella Enteritidis* in chickens which received a contact exposure within 24 hrs of hatching. *J Vet Med Sci*. 1993;55:649–53.
31. Phillips RA, Opitz HM. Pathogenicity and persistence of *Salmonella enteritidis* and egg contamination in normal and infectious bursal disease virus-infected leghorn chicks. *Avian Dis*. 1995;39:778–87.
32. Berchieri Júnior A, Freitas Neto OC. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior A, Silva EM, Di Fábio J, Sesti L, Zuanaze MAF. *Doenças das aves*. 2ª edição. Campinas: Ed. FACTA, 2011. 1004 p.
33. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem*. 1991;30(12):3875-83.
34. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1147:132–6.
35. Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorg Med Chem Lett*. 1993;3:225–30.
36. Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Blanche F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:992–8.
37. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag*. 2011;38:99-110.
38. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag*. 2005;26:343-56.
39. Paz AS. Utilização de diferentes aditivos promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. [Dissertação]. Cruz das Almas – BA: Universidade Federal da Bahia, Mestrado em Ciências Agrárias e Ambientais; 2006.
40. Rocha TM. Controle de *Salmonella Typhimurium* em frangos de corte utilizando composto com ácido benzóico, fumárico e 2-hidróxi-metil-tio-butanóico. [Dissertação]. Goiânia – GO: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2008.

41. Barrow PA, Lovell MA, Murphy CK, Page K. *Salmonella* infection in a commercial line of ducks; experimental studies on virulence, intestinal colonization and immune protection. *Epidemiol Infect.* 1999;123:121–32.
42. Berchieri Júnior A, Wigley P, Page K, Murphy CK, Barrow PA. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. *Avian Pathol.* 2001;30:297–310.
43. Gast RK, Beard CW. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in chicks. *Poult Sci.* 1989;68:1454–60.
44. Previato do Amaral PFG, Otutumi LK, Rodrigues GV, Lima ET, Fernandes JIM, Vendrame A, Mezalira TS, Suenaga SS, Sestari DAO, Cestari IED, Martins LA. Assessment of benzophenanthridine and protopine alkaloids in broiler challenged and not by *Salmonella* Heidelberg. *Braz J Poult Sci.* 2016;18(3):525-34.
45. Lourenço MC. Alterações histológicas e imunológicas de frangos desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella enterica*. [Tese]. Curitiba – PR: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias; 2016.
46. Vieira SL, Oyarzabal OA, Freitas DM, Berres J, Peña JEM, Coneglian JLB. Performance of Broilers Fed Diets Supplemented with Sanguinarine and Organic Acids. *J Appl Poult Res.* 2008;17(1):128-33.
47. Uni Z, Smirnov A, Sklan D. Pre- and Posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. *Poult Sci.* 2003;82:320–7.
48. Amit-Romach E, Uni Z, Cheled S, Berkovich Z, Reifen R. Bacterial population and innate immunity-related genes in rat gastrointestinal tract are altered by vitamin A-deficient diet. *J. Nutritional Biochemistry.* 2009; 20:70-7.

CAPÍTULO 5 – EFEITO IMUNOMODULADOR DO EXTRATO ETANÓLICO DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *Salmonella* HEIDELBERG

RESUMO: O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação do extrato etanólico de cascas e sementes de *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba) sobre o sistema imunológico de frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Heidelberg e criados até os 28 dias de idade. Foram utilizados 336 pintos machos de um dia de idade distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso em quatro tratamentos com sete repetições cada: CN – grupo controle negativo, que recebeu solução salina esterilizada a 0,85% via ingluvívio; EJ – grupo que recebeu apenas o extrato vegetal na ração; SH – grupo que recebeu o inóculo bacteriano via ingluvívio; e SH + EJ – grupo que recebeu o inóculo bacteriano via ingluvívio e o extrato vegetal na ração. A suplementação com o extrato reduziu o número de linfócitos no sangue das aves aos 28 dias e não teve efeito sobre a colonização nos órgãos por *Salmonella*, mas aumentou a quantidade de linfócitos no baço e bursa aos 11 e 28 dias de idade, respectivamente. *Salmonella* reduziu o peso da bursa e a quantidade de heterófilos e linfócitos circulantes aos 11 dias de idade. Conclui-se que a suplementação com extrato atuou sobre o sistema imune das aves, porém esse efeito não foi suficiente para evitar a colonização de órgãos extra-intestinais em frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Heidelberg.

Palavras-chave: anticorpos, fitogênicos, imunidade, linfócitos, salmonelose.

CHAPTER 5 - IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) ETHANOLIC EXTRACT IN BROILER CHICKENS EXPERIMENTALLY INOCULATED WITH *Salmonella* HEIDELBERG

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of ethanolic extract of peels and seeds of *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba) supplementation in immune system of broilers experimentally inoculated with *Salmonella* Heidelberg and reared until 28 days-old. 336 one-day- old male chicks distributed in a completely randomized design with four treatments each with seven replications: CN - negative control, which received sterilized saline solution at 0.85% in crop; EJ - group that received only the herbal extract in the diet; SH – group that received the inoculum bacterial in crop; and SH + EJ - group that received bacterial inoculum in crop and the herbal extract in the feed. The supplementation with the extract reduced the number of lymphocytes in the blood of birds at 28 days and had no effect on *Salmonella* organ colonization, but increased the number of lymphocytes in the spleen and bursa at 11 and 28 days of age, respectively. *Salmonella* reduced bursa weight and the amount of circulating heterophils and lymphocytes at 11 days of age. It is concluded that the supplementation with extract acted on the immune system of the birds, but this effect wasn't enough to avoid the colonization of extraintestinal organs in broilers experimentally inoculated with *Salmonella* Heidelberg.

Keywords: antibodies, phytochemicals, immunity, lymphocytes, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

Em frangos de corte, as infecções causadas por bactérias do gênero *Salmonella* são, em sua maioria, subclínicas. Desse modo, este patógeno pode propagar-se facilmente entre as aves, tornando-as portadores saudáveis que excretam a bactéria de forma intermitente ou persistente¹. Neste contexto, *Salmonella* Heidelberg configura como um dos sorovares mais importantes na avicultura industrial e já foi isolado em inúmeras granjas de frangos de corte, perus e galinhas poedeiras de vários países, inclusive no Brasil².

O desafio imunológico determinado por agentes infecciosos promove o consumo de grande quantidade de energia e nutrientes necessários para produção de células e moléculas envolvidas com a defesa do organismo, o que pode causar impactos sobre o desempenho das aves^{3,4}. Com o intuito de manipular o sistema imunológico a favor de um estado saudável do animal, uma das áreas da pesquisa que mais tem atraído a atenção dos técnicos em avicultura é a imunomodulação, que é a utilização de agentes capazes de modificar a resposta imune, sobre a qual pode exercer efeito inibitório ou estimulatório⁵.

O metabolismo secundário das plantas originam diversos compostos que apresentam atividade imunomoduladora^{6,7}, que podem promover o aumento da resistência à infecções e auxiliar na terapêutica de enfermidades imunossupressoras ou de etiologia multifatorial⁸. Quando empregados na alimentação animal, os produtos oriundos de plantas são definidos como aditivos fitogênicos, para diferenciar daqueles utilizados na terapêutica⁹. Entretanto, devido a escassez de estudos sobre o mecanismo de ação específicos desses aditivos e possíveis efeitos adversos, a utilização dos fitogênicos como imunomoduladores ainda é insignificante¹⁰.

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente sobre as potenciais atividades biológicas de *Myrciaria cauliflora*, devido a grande quantidade de compostos bioativos já detectados em seus frutos¹¹. Popularmente conhecida como jabuticabeira, a espécie é uma árvore frutífera pertencente à família Myrtaceae e ocorre espontaneamente no Brasil, sendo encontrada do Pará até o Rio Grande do Sul^{12,13}. A diversidade de compostos fenólicos encontrados na jabuticaba, como taninos, flavonoides, ácido elágico e antocianinas podem atuar sobre o sistema imunológico¹⁴, o que justifica as pesquisas com o propósito de determinar possíveis efeitos imunomoduladores e níveis de inclusão na dieta dos animais¹².

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar a atividade imunomoduladora do extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba em frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Heidelberg.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária, e no Laboratório Multiuso da Pós-graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia – UFG.

O protocolo experimental utilizado nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA – UFG sob o n° 107/2015.

Delineamento experimental

No experimento foram utilizados 336 pintos de corte de um dia de idade, machos da linhagem Cobb 500, os quais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em quatro tratamentos com sete repetições cada e alojados em grupos de 12 aves por unidade experimental. As aves foram pesadas e alojadas conforme o seguinte delineamento: T1 - consistiu o grupo controle negativo (CN); T2 – recebeu somente o extrato etanólico de jabuticaba na ração (EJ); T3 – recebeu o inóculo com *Salmonella* Heidelberg via ingluvío (SH); T4 – recebeu o inóculo com *Salmonella* Heidelberg via ingluvío e extrato etanólico na ração (SH + EJ).

As aves inoculadas e não inoculadas foram mantidas em alojamentos separados, em baterias de aço galvanizado com quatro andares, equipadas com comedouros e bebedouros do tipo lineares e bandejas para retirada de excretas, mantendo-se a mesma ambiência entre os alojamentos. As baterias foram aquecidas com lâmpadas incandescentes (uma por andar) de 60W até os 14 dias de idade.

Preparação do inóculo e inoculação das aves

O inóculo foi elaborado com *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolada de amostras provenientes de frangos de corte concedidas pelo Laboratório de Bacteriologia, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e tipificada pelo Laboratório FIOCRUZ-RJ.

A cepa foi repicada em ágar verde brilhante e posteriormente mantida em temperatura de incubação de 37°C por 24 horas. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, armazenada a 4°C. A concentração de $4,6 \times 10^7$ UFC/mL foi ajustada com auxílio da escala Mac Farland e confirmada por plaqueamento das diluições seriadas em ágar MacConkey, com posterior incubação a 37°C por 24 horas e contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Salmonella* Heidelberg¹⁵.

A inoculação das aves foi realizada com um dia de idade, antes do alojamento. Com o auxílio de um pipetador automático, cada ave recebeu 0,3 mL de solução salina tamponada a 0,85% contendo $4,6 \times 10^7$ UFC/mL via oral.

Obtenção do extrato etanólico de cascas e sementes de *M. cauliflora*

O extrato líquido padronizado em compostos fenólicos da jabuticaba foi processado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia – UFG. O resíduo utilizado nessa pesquisa foi o subproduto da produção de fermentado de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O Berg.], composto basicamente de sementes e cascas dos frutos, gentilmente cedidos pela Vinícola Jabuticabal, situada no município de Hidrolândia/GO (16° 55' 32.35" S 49° 21' 39.76" W). O resíduo foi dessecado a 40 °C em estufa com circulação de ar. Em seguida, a amostra foi moída em moinho de facas com tamis número 100 (150 µm) e o pó resultante do material vegetal devidamente acondicionado em sacos plásticos e armazenados a uma temperatura de -10°C.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação empregando como solvente álcool a 45% (v/v). O processo extrativo foi constituído por três etapas: 1 - pré-intumescimento: durante um intervalo de 2 h com a proporção de 1 Kg do material vegetal com 3 L da mistura hidroalcoólica; 2 – repouso: a mistura anteriormente preparada foi deixada em repouso durante 24 h, fase conhecida como maceração intermediária; 3 – empacotamento: transferência do material anterior para um percolador de 10 L, completando o volume com a mesma mistura hidroalcoólica e percolação com um fluxo de aproximadamente 0,2 mL/min¹⁶.

Análises anteriores realizadas por Moreira¹⁷ revelaram que o extrato etanólico de cascas e sementes de jabuticaba utilizado no presente estudo apresentou 14,26% de fenóis totais, 5,12% de taninos, 28,23% de flavonoides, 2,10% de proteína e 1,75% de extrato etéreo, além de ácidos graxos saturados mirístico (0,52%), palmítico (26,65%) e esteárico (2,92%); monoinsaturados palmitoléico (1,22%) e oléico (11,12%); e poli-insaturados linoléico (39,15%) e linolênico (8,21%). A concentração do ácido elágico foi determinada pelo método de cromatografia de alta eficiência (CLAE), que indicou $130,02 \pm 0,62$ µg/mL do extrato.

Programa alimentar

O programa alimentar foi constituído por três rações experimentais diferentes: pré-inicial, inicial e crescimento (Tabela 1).

TABELA 1 - Composição percentual das rações experimentais fornecidas às aves durante o período experimental (1 - 28 dias de idade)

| Ingredientes (g/kg) | Pré-inicial (1-7 dias) | Inicial (8-21 dias) | Crescimento (22-28 dias) |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Milho grão | 554,00 | 574,20 | 623,00 |
| Farelo de soja (45%) | 381,70 | 351,70 | 313,40 |
| Óleo de soja | 20,80 | 27,40 | 29,90 |
| Calcário | 9,40 | 10,00 | 5,10 |
| Fosfato bicálcico | 19,00 | 24,60 | 17,10 |
| Sal comum | 5,00 | 4,50 | 4,20 |
| L-treonina | 1,10 | 0,60 | 0,30 |
| L-lisina HCL | 2,90 | 2,00 | 2,00 |
| DL-metionina | 3,60 | 2,40 | 2,40 |
| Premix vitamínico* | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Premix mineral** | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Inerte (amido) | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Nutrientes | | | |
| Energia metabolizável (kcal/kg) | 2.950 | 3.000 | 3.100 |
| Proteína bruta | 22,20 | 20,79 | 19,50 |
| Cálcio (%) | 0,92 | 1,11 | 0,73 |
| Fósforo disponível (%) | 0,47 | 0,40 | 0,34 |
| Sódio (%) | 0,22 | 0,21 | 0,20 |
| Lisina (%) | 1,31 | 1,27 | 1,08 |
| Metionina + cistina (%) | 0,94 | 0,81 | 0,79 |
| Metionina (%) | 0,65 | 0,54 | 0,52 |

* Suplemento vitamínico (níveis de garantia por kg do produto): vit. A, 1.680.000 UI; vit.D 3, 400.000 UI; vit. E, 3500 mg; vit. K, 360 mg; vit. B1, 436,50 mg; vit. B2, 1.200 mg; vit. B6, 624 mg; vit. B12, 2.400mcg; ác. Fólico, 200 mg; ác. pantotênico, 3.120 mg; niacina, 8.400 mg; biotina, 10.000 mcg.

** Suplemento mineral (níveis de garantia por kg do produto): zinco, 17.500 ppm; ferro, 12.500 ppm; cobre, 2.000 ppm; iodo, 187,50 ppm; selênio, 75 ppm.

Todas as rações utilizadas durante o experimento foram à base de milho moído e farelo de soja, formuladas de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais propostas pelas Rostagno et al.¹⁸, sem adição de promotores de crescimento. O extrato etanólico das cascas e sementes de jabuticaba foi adicionado à ração em substituição ao inerte (amido) na dosagem de 600 mg/kg de ração. Durante todo o período experimental, as aves receberam alimentação e água *ad libitum*.

Pesquisa de *Salmonella* em órgãos

Uma ave por parcela, no total de sete aves por tratamento, aos 11 e 28 dias de idade, foram submetidas à jejum alimentar de oito horas e eutanasiadas após insensibilização por inalação de CO₂ e secção da artéria femoral. Seus fígados, baços e tonsilas cecais foram

coletados assepticamente para análise bacteriológica, onde cerca de um grama dos fragmentos dos órgãos foram macerados e transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e 1 mL foi transferido para 9 mL de caldo Selenito Cistina (CS) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) seguindo-se a incubação a 37°C por 24 horas.

Após esse período, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas foram plaqueadas por esgotamento em superfície para os ágaros: Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4), Hektoen e Verde Brilhante, e novamente incubado a 37°C por 24 horas. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com características morfológicas de *Salmonella* foram selecionadas e três a cinco UFC por placa foram transferidas individualmente para tubos contendo Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e incubados a 37°C por 24 horas. As culturas em TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste de urease, produção de indol, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato de Simmons. Quando as provas bioquímicas eram compatíveis com *Salmonella*, as amostras foram submetidas ao teste sorológico com soro polivalente anti-O e as positivas foram encaminhadas à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)-RJ em ágar nutriente para tipagem sorológica.

Exame biométrico dos órgãos

As aves (anteriormente à necropsia) e seus fígados, baços e bursas foram colhidos e pesados. Para efetuar o cálculo foi considerado o peso relativo do órgão/peso da ave $\times 100^{19}$.

Contagem de linfócitos nos órgãos

Durante a necropsia, fragmentos de baço, bursa, timo e tonsila cecal foram colhidos e armazenados em formalina neutra a 10% e posteriormente processados de acordo com a metodologia proposta por Luna²⁰.

Foram capturadas imagens de dez campos de cada um dos fragmentos de baço, bursa e tonsila cecal de cada ave, para posterior contagem de linfócitos, com o auxílio do software *Image J*. Um retículo quadrangular constituído por 30 pontos foi sobreposto à imagem histológica digitalizada e somente foram contados os linfócitos nas intersecções presentes no campo visual.

Contagem de heterófilos e linfócitos no sangue

Aos 11 e 28 dias de idade, obteve-se amostras de sangue de sete aves de cada tratamento por venopunção na região coxofemoral com auxílio de seringas descartáveis, que foram posteriormente acondicionadas em tubo comercial contendo anticoagulante fluoreto de sódio e EDTA.

As contagens diferenciais de heterófilos e linfócitos foram obtidas mediante leitura dos esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico Panótico rápido, realizada em microscópio utilizando-se aumento 100 x em óleo de imersão.

Análise Estatística

Os resultados de biometria e contagem de células foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para os estudos de colonização de *Salmonella* Heidelberg em órgãos foi utilizado o teste de χ^2 . Em ambos, a avaliação dos dados foi realizada pelo programa estatístico R, versão 3.2.2²¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão descritas as frequências de isolamento de *Salmonella* em diferentes órgãos das aves aos 11 e 28 dias de idade.

TABELA 2 – Frequência de isolamento (%) de *Salmonella* em amostras de fígado, baço e tonsila cecal das aves

| Tratamentos* | 11 dias | | | | | | 28 dias | | | | | |
|------------------|---------|------|--------|------|---------|------|---------|------|------|-----|---------|-----|
| | Fígado | | Baço | | Tonsila | | Fígado | | Baço | | Tonsila | |
| | (+) | (%) | (+) | (%) | (+) | (%) | (+) | (%) | (+) | (%) | (+) | (%) |
| CN | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 |
| EJ | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 |
| SH | 2/7 | 28,6 | 2/7 | 28,6 | 3/7 | 42,8 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 |
| SH + EJ | 5/7 | 71,4 | 2/7 | 28,6 | 4/7 | 57,1 | 3/7 | 42,8 | 0/7 | 0 | 0/7 | 0 |
| <i>P</i> valor** | 0,0052 | | 0,1979 | | 0,0212 | | 0,0179 | | NS | | NS | |

*CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

**Teste do qui-quadrado de Pearson

Conforme observado na Tabela 2, *Salmonella* não foi isolada nas amostras dos grupos controle negativo (CN) e que recebeu somente o extrato (EJ), o que certifica que não houve contaminação cruzada entre os tratamentos.

De acordo com a Tabela 2, a frequência de isolamento de *Salmonella* no fígado ($P=0,0052$) e na tonsila cecal ($P=0,0212$) aos 11 dias de idade foi superior no grupo inoculado que recebeu o extrato (SH + EJ). Aos 28 dias de idade este resultado se repetiu parcialmente, já que a bactéria foi isolada apenas nas amostras de fígado das aves ($P=0,0179$).

Na literatura estão descritos a ação de alguns fitoquímicos presentes na casca da jabuticaba, como flavonoides, alcaloides, glicosídeos, taninos e terpenoides, que atuam na inibição de citocinas e outros mediadores anti-inflamatórios responsáveis pela quimiotaxia de células do sistema imune, aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e agregação plaquetária²²⁻²⁶. Com base nestas informações, sugere-se que os compostos fitoquímicos contidos no extrato inibiram os mediadores inflamatórios responsáveis pelo estabelecimento de resposta imune celular efetiva, o que consequentemente comprometeu o combate à bactéria inoculada. Esta afirmação encontra respaldo em Quatrin²⁷, que verificou redução da expressão dos marcadores relacionados à resposta inflamatória aguda, como IL-6 (interleucina 6), IL-1 (interleucina 1) e TNF- α (fator de necrose tumoral – alfa) em cobaias alimentadas com o pó do fruto de *M. cauliflora*.

Nas duas idades avaliadas foi possível isolar *Salmonella* nas amostras de fígado, baço e tonsila em pelo menos duas das sete amostras analisadas, o que indica que a bactéria conseguiu superar as barreiras imunológicas intestinais. De acordo com Hirsh²⁸ muitos sorovares de *Salmonella* possuem capacidade de sobreviver no interior de fagócitos e promover a colonização de outros órgãos além do intestino, principalmente aqueles ricos em monócitos e macrófagos, tais como fígado e o baço.

Durante o estudo, não foram evidenciadas morbidade ou lesões macroscópicas sugestivas de salmonelose nos órgãos avaliados, o que caracteriza o estado de portador inaparente. Por se tratarem de órgãos que podem ser destinados ao consumo humano direto (fígado) ou para fabricação de farinhas que compõe a alimentação de outros animais (baço e tonsila), a presença de portadores inaparentes constitui um fator epidemiológico relevante no controle das salmoneloses, devido à ausência de sintomatologia e dificuldade em detectá-los antes e durante a inspeção sanitária²⁹. Portanto, representam um potencial reservatório de bactérias patogênicas para outros animais e também humanos³⁰.

Na Tabela 3 estão expressos os valores médios do peso relativo de órgãos das aves aos 11 e 28 dias de idade.

TABELA 3 – Médias dos pesos relativos do fígado, baço e bursa aos 11 e 28 dias de idade observados em cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | 11 dias de idade | | | 28 dias de idade | | |
|--------------|------------------|-------|-------------------|------------------|--------|--------|
| | Fígado | Baço | Bursa | Fígado | Baço | Bursa |
| CN | 3,82 | 0,10 | 0,18 ^b | 2,34 | 0,16 | 0,12 |
| EJ | 3,63 | 0,08 | 0,22 ^a | 2,5 | 0,11 | 0,11 |
| SH | 3,49 | 0,08 | 0,17 ^b | 2,33 | 0,16 | 0,18 |
| SH + EJ | 3,57 | 0,08 | 0,18 ^b | 2,45 | 0,12 | 0,17 |
| CV (%) | 8,86 | 29,38 | 11,73 | 12,58 | 30,32 | 37,7 |
| <i>P</i> | 0,3317 | 0,387 | 0,0066 | 0,6634 | 0,0967 | 0,0841 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

*CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Conforme demonstrado na Tabela 3, não houve influência ($P > 0,05$) da inoculação com *Salmonella* Heidelberg ou da suplementação com o extrato de jabuticaba sobre o peso do fígado e baço nas duas idades pesquisadas, o que indica a bactéria inoculada não produziu reação inflamatória suficiente para alterar o peso dos órgãos avaliados.

Aos 11 dias de idade, a suplementação com o extrato vegetal aumentou o peso da bursa das aves ($P < 0,05$). De acordo com Ribeiro et al.³¹, o peso dos órgãos linfoides pode refletir a capacidade do organismo em produzir células de defesa. Ainda que a imunidade

humoral não seja a mais efetiva contra *Salmonella*, o aumento na população desta linhagem celular pode influenciar diretamente a produção de anticorpos contra o agente³².

As médias das contagens de linfócitos em órgãos linfoides das aves aos 11 e 28 dias de idade estão demonstradas na Tabela 4.

TABELA 4 – Médias da contagem de linfócitos do baço, bursa e tonsila cecal aos 11 e 28 dias de idade observados em cada um dos tratamentos experimentais

| Tratamentos* | 11 dias de idade | | | 28 dias de idade | | |
|--------------|------------------|---------------------|---------|--------------------|--------|---------|
| | Baço | Bursa | Tonsila | Baço | Bursa | Tonsila |
| CN | 13,06 | 15,15 ^{ab} | 9,82 | 10,72 ^b | 9,67 | 11,12 |
| EJ | 10,42 | 15,90 ^a | 9,83 | 13,67 ^a | 11,15 | 12,36 |
| SH | 11,57 | 15,13 ^{ab} | 10,40 | 10,47 ^b | 11,50 | 11,17 |
| SH + EJ | 11,65 | 13,80 ^b | 10,87 | 10,46 ^b | 11,50 | 11,73 |
| CV (%) | 16,81 | 4,98 | 14,60 | 10,57 | 12,73 | 15,26 |
| <i>P</i> | 0,4079 | 0,0432 | 0,7374 | 0,008 | 0,2659 | 0,7804 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

*CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Observa-se na Tabela 4 que, aos 11 dias de idade, as aves do tratamento que recebeu apenas o produto vegetal na ração (EJ) apresentaram maior quantidade de linfócitos na bursa ($P < 0,05$), o que refletiu diretamente sobre o peso do órgão, conforme apresentado na Tabela 3. O mesmo efeito foi observado no baço das aves deste mesmo grupo aos 28 dias de idade ($P < 0,05$).

Segundo Lima et al.³³, as cascas de jabuticaba possuem quantidades consideráveis de lectina, cuja função na planta ainda não é bem elucidada, porém sugere-se que ela atue na defesa do vegetal contra o ataque de microrganismos patogênicos³⁴⁻³⁶. Além disso, as lectinas atuam como agente mitogênico por induzirem a proliferação de linfócitos *in vitro* e *in vivo*^{37,38}. Entretanto, essa proteína pode exercer atividade antimitogênica, dependendo das condições experimentais em que é utilizada³⁷, o que indica que a dosagem do extrato de jabuticaba empregada neste estudo pode ter estimulado a multiplicação linfocitária.

Na Tabela 5 estão expressos os valores médios da contagem de células da linhagem linfóide no sangue das aves aos 11 e 28 dias de idade.

TABELA 5 – Valores de contagem de heterófilos (H), linfócitos (L) e relação heterófilo/linfócito (H/L) de cada um dos tratamentos experimentais aos 11 e 28 dias de idade

| Tratamentos | 11 dias de idade | | | 28 dias de idade | | |
|-------------|--------------------|--------------------|--------|--------------------|--------------------|--------|
| | H | L | H/L | H | L | H/L |
| CN | 5575 ^a | 6697 ^a | 0,81 | 2703 ^b | 6263 ^a | 0,45 |
| EJ | 4082 ^{ab} | 4702 ^{ab} | 0,94 | 3334 ^b | 3519 ^b | 1,00 |
| SH | 2001 ^c | 3286 ^b | 0,60 | 10046 ^a | 4297 ^{ab} | 1,16 |
| SH + EJ | 3481 ^b | 4724 ^{ab} | 0,80 | 2703 ^b | 4279 ^{ab} | 1,02 |
| CV (%) | 24,8 | 33,2 | 38,0 | 24,5 | 29,8 | 47,0 |
| <i>P</i> | <0,001 | 0,0098 | 0,3100 | <0,001 | 0,0373 | 0,0806 |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de Tukey a 5%.

*CN: controle negativo; EJ: inoculado com extrato vegetal na casca; SH: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca; SH + EJ: inoculado com *Salmonella* Heidelberg na casca e tratado com extrato vegetal.

Aos 11 dias de idade, no grupo que recebeu apenas a bactéria foram encontradas menores quantidades de heterófilos quando comparado ao grupo controle negativo ($P < 0,05$). Resultado semelhante foi relatado por Lam e Munn³⁹, que observaram *in vitro* a redução do número de heterófilos após o contato com cepas de *Salmonella* Typhimurium. Segundo os autores, esse fenômeno parece ser causado por uma rápida degranulação dos heterófilos. A realização da degranulação ao invés da fagocitose libera uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas, radicais de oxigênio e outros mediadores, que provocam a lise do heterófilo e lesões em tecidos adjacentes.

Também aos 11 dias foi constatada a redução do número de linfócitos circulantes no sangue das aves do grupo inoculado (SH) ($P < 0,05$). Segundo Ewald et al.⁴⁰ e Bridle et al.⁴¹, a quantidade de linfócitos no sangue periférico é um bom parâmetro para se avaliar a imunocompetência em aves, já que o menor número de células pode indicar um aumento da suscetibilidade à doenças, o que pôde ser comprovado no presente estudo, já que nesta mesma idade foi possível isolar *Salmonella* dos órgãos pesquisados do tratamento SH, mesmo na ausência de sinais clínicos.

Aos 28 dias de idade as aves que receberam apenas o inóculo apresentaram maior quantidade de heterófilos no sangue ($P < 0,001$). Este resultado sugere que houve maior aporte na produção desta linhagem celular pela medula óssea devido ao estímulo gerado pela infecção por *Salmonella*. Essa afirmação encontra respaldo em Mitchell e Johns⁴², que relatam que processos infecciosos promovem o incremento na quantidade de heterófilos no sangue das aves.

CONCLUSÕES

A adição do extrato etanólico de jabuticaba na ração de frangos de corte proporciona efeito positivo sobre o sistema imunológico das aves, aumentando a quantidade de linfócitos no baço e bursa nas idades avaliadas. Porém, este efeito não observa-se nas aves inoculadas com *Salmonella* Heidelberg.

REFERÊNCIAS

1. Borsoi A, Quinteiro-Filho WM, Calefi AS, Ferreira AJ, Astolfi-Ferreira CS, Florio JC, Palermo-Neto J. Effects of cold stress and *Salmonella* Heidelberg infection on bacterial load and immunity of chickens. *Avian Pathol.* 2015;44(6):490-7.
2. Borsoi A, Do Santos LR, Rodrigues LB, Moraes HLS, Salle CTP, Do Nascimento VP. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. *Braz J Microbiol.* 2011;42:266-73.
3. Klasing K, Kover D. Leukocytic Cytokines regulate growth rate and composition following activation of the immune system. *J Anim Sci.* 1997;75(2):58-67.
4. Klasing K. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult Sci.* 1998;77:1119-25.
5. Dutta RC. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. *Immunol Lett.* 2002;83(3):153-61.
6. Hashemi SR, Davoodi H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Asian J Anim Vet Adv.* 2012;7(2):105–16.
7. Punturee K; Wild CP; Vinitketkumneun U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages. *J Ethnopharm.* 2004;95:183-9.
8. Appolinário CM, Megid J. Uso de imunomoduladores nas enfermidades infecciosas dos animais domésticos. *Semina.* 2007;28(3):437-48.
9. Windisch W, Kroismayr A. The effects of phytobiotics on performance and gut function in monogastrics. *BioMin World Nutrition Forum.* 2006. Disponível em: <http://http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/forums/theeffect-phytobiotics-performance-t4870/p0.htm>.
10. Nunes-Pinheiro DCS, Leite AKRM, Farias VM, Braga LT, Lopes CAP. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. *Ciência Animal.* 2003;13(1):23-32.
11. Hacke ACM, Granato D, Maciel LG, et al. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds: chemical characterization and extraction of antioxidant and antimicrobial compounds. *J Food Sci.* 2016;81(9):c2206-17.
12. Borges LL, Conceição EC, Silveira D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. *Food Chem.* 2014;153:224-33.
13. Brunini MA, Oliveira AL, Salandini CAR, Bazzo FR. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jabuticabas (*Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg) cv “SABARÁ.” *Cienc e Tecnol de Aliment.* 2004; 24:378–83.

14. Yunis-Aguinaga J, Fernandes DC, Eto SF, et al. Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol.* 2016;58:284-91.
15. Fernández A, Lara C, Loste A, Calvo S, Marca MC. Control of of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2001; 24: 207-16.
16. List PH, Schmidt T. *Phytopharmaceutical Technology.* Florida, USA: CRC Press; 2000.
17. Moreira JS. Extrato padronizado de jaboticaba na alimentação de frangos e poedeiras comerciais [Tese]. Goiânia – GO: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2017.
18. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa: EdUFV, 2011, p. 252.
19. Grieves DB. Immunophysiology. In: Surkie PD. *Avian Physiology*, 4 ed. Tennessee: Kingsport Press; 1991. 685p.
20. Luna LG. *Manual of Histologic. Staining Methods of the Armed Forces.* Institute of Pathology. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258 p.
21. The R Foundation for Statistical Computing. Versão 3.2.2, 2015.
22. Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Arichi, S. Effects of caffetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *J Nat Prod.* 1987;50: 392–9.
23. De Las Heras B, Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation & Allergy.* 2009;8(1):28-39.
24. Baeuerle, P.A.; Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-179.
25. Siebenlist, U.; Franzoso, G.; Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:405-55.
26. Benjamim CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Medicina Ribeirão Preto.* 2001; 34: 18-26.
27. Quatrin A. Efeito da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) sobre estresse oxidativo e resposta inflamatória em modelo de diabetes *mellitus* tipo 2 em ratos. [Tese]. Santa Maria: Centro de Ciências e Saúde, Universidade Federal de Santa Maria; 2014.
28. Hirsh DC, Zee YC. *Microbiologia Veterinária.* 1ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.

29. Tessari ENC, Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Luciano RL, De Castro AGM, Cardoso ALSP. Important aspect of *Salmonella* in the poultry industry and in public health. In: Mahmoud BSM, editor. *Salmonella – A dangerous foodborne pathogens*. InTech; 2012. 450p.
30. Perron GG, Bell G, Quessy S. Parallel evolution of multidrug-resistance in *Salmonella enterica* isolated from swine. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;281:17–22.
31. Ribeiro AML, Vogt LK, Canal CW, Laganá C, Streck AF. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. *R Bras Zootec*. 2008;37(4):636-44.
32. Arafat N, Eladl A, Mahgoub H, El-shafei RA. Effect of infectious bursal disease (IBD) vaccine on *Salmonella* Enteritidis infected chickens. *Vaccine*. 2017;35:3682-9.
33. Lima AJB, Corrêa AD, Alves APC, Abreu CMP, Dantas-Barros AM. Caracterização química do fruto da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Arch Latinoam Nutr*. 2008;58(4):416-21.
34. Cavada BS, Santos CF, Granjeiro TB, et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochem*. 1998;49:675-80.
35. Ratanapo S, Ngamjunyaporn W, Chalavatnatol M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. *Plant Sci*. 2001;160:739-44.
36. Sacchettini JC, Brewer CF. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochem*. 2005;40:3009-15.
37. Kilpatrick DC. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Mol Biotechnol*. 1999;11:55-65.
38. Banerjee S, Hess D, Majumder P, Roy D, Das S. The interactions of *Allium sativum* leaf agglutinin with a chaperonin group of unique receptor protein isolated from a bacterial endosymbiont of the mustard aphid. *J Biol Chem*. 2004;279: 23782- 9.
39. Lam KM, Munn RJ. The cytolytic effects of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on chickens heterophils. *Avian Pathol*. 2002;31:277-83.
40. Ewald SJ, Lien YY, Li L, Johnson LW. B-haplotype control of CD4/ CD8 subsets and TCRV beta usage in chicken t lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996; 53(3/4):285-301.
41. Bridle BW, Julian R, Shewen PE, Vaillancourt JP, Kaushik AK. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. *Can J Vet Res*. 2006; 70(3)183-90.
42. Mitchell EB, Johns J. Avian hematology and related disorders. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2008;11:501-22.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de *Salmonella* na avicultura industrial sempre foi uma das áreas que mais concentram os esforços de pesquisadores e técnicos, haja vista que este microrganismo pode ocasionar grandes perdas econômicas relacionadas ao fraco desempenho das aves, mortalidade, custos com medicamentos e medidas de controle, além de acarretarem restrições à comercialização dos produtos avícolas em mercados internacionais.

Neste contexto, a utilização do resíduo agroindustrial da jabuticaba, pela grande quantidade de metabólitos com atividade antimicrobiana, poderia influir positivamente sobre o controle de *Salmonella* em diferentes fases da produção avícola, para tanto, seriam necessárias avaliações sistemáticas para verificar sua ação e possíveis efeitos tóxicos sobre o organismo animal.

A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* revelou baixa capacidade inibitória sobre as cepas de *Salmonella*, entretanto, sabe-se que os resultados obtidos *in vitro* não necessariamente refletem o que acontece no organismo animal e que os fitoquímicos presentes no extrato apresentam diversas propriedades biológicas que poderiam ser verificadas com maior definição nas aves.

A aplicação do produto vegetal nos ovos férteis demonstrou não ser viável, principalmente devido as características físicas do extrato, que prejudicou a oxigenação do embrião e promoveu altos índices de mortalidade embrionária. Porém, este problema pode ser solucionado empregando outras formas de apresentação do extrato, como *sprays* ou combinado com veículos que não obstruam os poros da casca.

Quando adicionada a ração das aves, a dosagem do extrato utilizada não afetou os índices zootécnicos. O produto também promoveu a intensificação da colonização intestinal e de outros órgãos por *Salmonella*, mesmo que tenha sido observado aumento de células de defesa no sangue e em órgãos linfoides das aves. Este fato reflete a necessidade de maiores estudos sobre os efeitos e níveis seguros do uso do extrato etanólico de jabuticaba em animais, considerando-se que o produto vegetal atuou sobre alguma característica do hospedeiro ou do agente que promoveu maior intensidade e duração da infecção.

Um dos grandes desafios no emprego de fitogênicos na alimentação dos animais está na compreensão dos efeitos destes compostos sobre a microbiota intestinal, que pode alterada em detrimento ao hospedeiro, promovendo o estabelecimento de agentes patogênicos. Portanto, os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir para futuras pesquisas utilizando o extrato etanólico de jabuticaba como aditivo em dietas animais.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiania, 28 de março de 2016.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA/ENSINO
PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 107/2015**

I IDENTIFICAÇÃO:

1. *Título do projeto:* Utilização de *Mycobacteria cauliflora* no controle de *Salmonella* SP. Na produção de frangos de corte.
2. *Pesquisador Responsável:* Angélica Ribeiro Araújo Leonídio/EVZ
3. *Unidade/Órgão:* EVZ/UFG/ GOLÂNDIA
4. *Pesquisadores Participantes:* Maria Auxiliadora Andrade, Regiani Nascimento Gagno Pôrto, Leila Maria Leal Parente.
5. *Unidade onde será realizado:* EVZ/UFG/ GOLÂNDIA
6. *Data de apresentação do protocolo à CEUA:* 08/12/2015
7. *Data do Relatório:* 15/02/2016
8. *Data de Atendimento das Pendências:* 11/02/2015
9. *Data do Segundo Relatório:* 07/03/2016

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o *Relatório Final* baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 11/2017.

III - Data da reunião: 28/03/2016


Dra. Rosângela Mafra e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG