

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

**ADITIVOS FITOGÊNICOS PARA FRANGOS DE CORTE
EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *Salmonella enterica*
SOROVAR ENTERITIDIS**

Ana Caroline de Souza Barnabé
Orientadora: Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA
2012



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

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

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Ana Caroline de Souza Barnabé** E-mail: **anavetcarol@yahoo.com.br**

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

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: **Aditivos fitogênicos para frangos de corte experimentalmente inoculados com Salmonella enterica sorovar Enteritidis** Palavras-chave: **aves, fitoterápicos, linfócitos, promotor de crescimento, salmonelose**

Título em outra língua: **Phytogenics additive for broiler experimentally inoculated with Salmonella enterica serovar Enteritidis**

Palavras-chave em outra língua: **birds, growth promoter, lymphocytes, phytoterapic, salmonellosis**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos**

Data defesa: (dd/mm/aaaa) **24/02/2012**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

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

Co-orientador(1): **Cíntia Silva Minafra e Rezende** E-mail: **cintia@cpa.vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **José Henrique Stringhini** E-mail: **henrique@vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☐ total ☒ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[X] Capítulos. Especifique: **1 e 4**

[] Outras restrições: Trabalho ainda não foi publicado. Resultados e discussão não podem ser divulgados antes da publicação dos artigos referentes à dissertação.

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

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

Goiânia 28 de setembro de 2012

Ana Caroline de Souza Barnabé
Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ

**ADITIVOS FITOGÊNICOS PARA FRANGOS DE CORTE
EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *Salmonella enterica*
SOROVAR ENTERITIDIS**

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

Área de Concentração

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa

Etiopatogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle das
doenças infecciosas dos animais

Orientadora

Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Cíntia Silva Minafra e Rezende - UFG

Prof. Dr. José Henrique Stringhini - UFG

GOIÂNIA
2012

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

Barnabé, Ana Caroline de Souza.
B259a Aditivos fitogênicos para frangos de corte experimentalmente
 inoculados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis
 [manuscrito] / Ana Caroline de Souza Barnabé. – 2012.
 xv, 57 f. : il., figs, tabs.

 Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade;
 Coorientadores: Prof^a. Dr^a Cíntia Silva Minafra e Rezende, Prof.
 Dr. José Henrique Stringhini.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
 Escola de Veterinária e Zootecnia, 2012.
 Bibliografia.
 Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
 Apêndices.

 1. Frangos de corte – Inoculação. 2. *Salmonella* em
 animais. I. Título.

CDU:636.52/.58:616-022.1

ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ

Dissertação defendida e aprovada em **24/02/2012**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



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



Profa. Dra. Aline Mondini Calil Racanicci - UnB/DF



Profa. Dra. Alessandra Gimenez Mascarenhas - EVZ/UFG

Dedico

Aos meus pais que com amor e
carinho me deram a melhor
herança que um filho pode
receber: a educação

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por mais esta conquista, por me dar saúde, força, inteligência e disposição durante toda minha vida.

A minha família por toda compreensão, paciência, apoio e amor incondicional. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

A minha orientadora Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade que direcionou minha escolha profissional. Agradeço pela oportunidade, confiança, aprendizado, amizade e tempo dispensados a mim.

Aos professores da Escola de Veterinária e Zootecnia, em especial à Cíntia Silva Minafra e Rezende, José Henrique Stringhini, Jurij Sobestiansky, Maria Lúcia Gambarini Meirinhos pelas contribuições dadas durante a execução do experimento.

A todos os estagiários do Laboratório de Bacteriologia e os colegas de Pós Graduação que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, em especial agradecimento à André, Dunya, Eliete, Fernanda, Gisele, Hilari, Juliana, Marcos, Pedro, Rejane, Thayanara e Thiago.

A todos os colaboradores da UFG cuja participação foi fundamental para a conclusão deste trabalho, especialmente à Sr. Antônio (fábrica de rações), Sr. Antônio (Laboratório de Histopatologia), Cícera, Sr. Francisco, Gerson, João Cunha, Maria Auxiliadora Leão (Dorinha) e Tânia.

A empresa GRASP, especialmente ao médico veterinário José Luis Soares, pelo financiamento do experimento, além da competência em auxiliar o trabalho.

A empresa Super Frango, especialmente a Leandro Silva Chaves, Roberta Galvão Evangelista e Roberto Moraes Jardim Filho por toda a ajuda indispensável para a condução dos experimentos.

A Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e ao CNPq pela oportunidade concedida.

A todos os meus sinceros agradecimentos!

“Vencer a si próprio é a maior das vitórias”

(Platão)

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
REFERENCIAS.....	5
CAPÍTULO 2 - Efeitos dos aditivos fitogênicos no desempenho e na integridade intestinal de frangos de corte inoculados experimentalmente com <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Delineamento experimental.....	13
Preparação do inóculo.....	14
Inoculação das aves.....	14
Programa alimentar.....	14
Desempenho.....	16
Exame histomorfométrico intestinal	16
Quantificação de pH.....	14
Análises Estatísticas.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
CONCLUSÃO.....	25
REFERENCIAS.....	26
CAPÍTULO 3 - Atividades antimicrobianas e imunológicas de aditivos fitogênicos em frangos de corte inoculados experimentalmente com <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis.....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Delineamento experimental.....	33
Preparação do inóculo.....	34
Inoculação das aves.....	35
Exame biométrico de órgãos.....	35
Pesquisa de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis.....	35
Contagem de linfócitos em órgãos linfóides.....	36
Análises estatísticas.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	44

REFERENCIAS.....	45
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48

RESUMO

No presente estudo, foram utilizados 300 pintos com um dia de idade, machos, linhagem Cobb, com o objetivo de avaliar os efeitos dos aditivos fitogênicos sobre desempenho, a integridade intestinal e o sistema imunológico de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE). As aves foram divididas em cinco tratamentos com seis repetições cada. Tratamento (Ttm) 1 - grupo inoculado por via oral, com 0,1 mL de solução salina tamponada e esterilizada a 0,85% (Placebo); Ttm 2 - recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (Contr. AF); Ttm 3 - grupo inoculado via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (Contr. positivo SE); Ttm 4 - grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de SE e que recebeu como antimicrobiano promotor de crescimento (APC) a bacitracina metil dissilicato na dosagem de 55 ppm na ração até os 35 dias de idade (SE + APC); Ttm 5 - grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de SE que recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração do 1º aos 35 dias de idade (SE + AF). Foram realizadas análises de desempenho e seis aves por tratamento foram pesadas, sacrificadas e o pH do trato gastrointestinal foi aferido. Coletou-se fragmentos de duodeno e jejuno para análises histomorfométricas, morfometrias e contagem de linfócitos. Observou-se diferença significativa, durante o período de 1-35 final do experimento no peso médio e no ganho de peso dos grupos sem desafio microbiano, além de melhor conversão alimentar no grupo alimentado com aditivos fitogênicos. Observou-se maior altura dos vilos aos 14 dias no duodeno e maior relação vilo:cripta para o grupo que recebeu fitogênicos. O pH foi influenciado pelo APC no cólon e ceco. Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a biometria dos órgãos e *Salmonella* nos grupos. Observou-se a depleção linfóide nos baços, bursas e tonsilas cecais foi variável, com predominância de depleção discreta e moderada. Conclui-se que os aditivos fitogênicos controlam os efeitos da SE em frangos de corte como expresso nos dados de desempenho, especialmente na conversão alimentar, e dados histomorfométricos do intestino, embora não tenha impedido a migração da SE para os órgãos linfóides, bem como não estimulam a proliferação de células linfóide nos frangos de corte.

Palavras-chave: aves, fitoterápicos, linfócitos, promotor de crescimento, salmonelose

ABSTRACT

In this study, 300 1 day-old male Cobb chicks were used to evaluate, with the objective of evaluating the effects of phytogenic additives on performance, gut integrity and immune system of broilers inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). The birds were divided into five treatments with six repetitions each. Treatment (Ttm) 1 - group inoculated orally with 0.1 mL of sterile buffered saline 0.85% (placebo), Ttm 2 - phytogenic received additives in the feed at a dosage of 0.10 kg/ton feed of the initial age until 35 days (Contr. FA); Ttm 3 - group inoculated orally with 0.5 mL of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU/0.5mL *Salmonella enterica* serovars Enteritidis (Contr. positive SE); Ttm 4 - group inoculated orally with 0.5 mL of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU/0.5mL of SE and received as antimicrobial growth promoter (AGP) bacitracin methylene disalicylate at a dosage of 55 ppm in the feed until 35 days of age (SE + AGP); Ttm 5 - group inoculated orally with 0.5 mL of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU/0.5 mL SE received phytogenic additives in the feed at a dosage of 0.10 kg/ton of feed of 1 to 35 days old (SE + FA). Performance was evaluated and six birds for treatment were weighed, sacrificed and the pH of the gastrointestinal tract was measured. Fragments were collected duodenum and jejunum to histomorphometric analysis, morphometric lymphocyte count. There was significant difference in the period 1-35 of the experiment the average weight and weight gain of groups without microbial challenge, and feed conversion in the group feed with phytogenic. We observed greater higher villus height to 14 days in the duodenum and greater villus:crypt to the group that received phytogenic. The pH was influenced by the AGP in the colon and caecum. There was no significant effect of treatment on biometry of organs and *Salmonella* groups. There was lymphoid depletion in spleen, bursa and caecal tonsils was variable, with a predominance of mild and moderate depletion. It is concluded that the additives phytogenic control the effects of SE in broilers as expressed in the performance, especially in the feed conversion, and histomorphometric of the intestine, although it has not prevented the migration of the SE for the lymphoid organs, as well as not stimulate the proliferation of lymphoid cells in broilers.

Keywords: birds, growth promoter, lymphocytes, phytoterapic, salmonellosis

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil está entre os maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo, o que tem contribuído para o seu desenvolvimento econômico e social. Segundo dados da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (UBABEF), em 2010, o Brasil produziu 12.230 milhões de toneladas de carne de frango e, deste total, 69% foi destinado ao consumo interno e 31% para exportação (UBABEF, 2011). O grande avanço da produção avícola se deve à evolução tecnológica e científica nas áreas da nutrição, da genética e da sanidade. No entanto, a seleção genética de aves cada vez mais precoce aliada ao aumento das densidades de alojamentos, objetivando a redução de custos e maior produtividade dos lotes têm proporcionado o aparecimento de problemas sanitários nos plantéis avícolas.

Um dos grandes desafios da avicultura industrial nos últimos anos é o aparecimento de doenças entéricas nos plantéis que tem determinado perda de produtividade, aumento de mortalidade e de contaminação dos seus produtos, os quais têm sido frequentemente relacionados com casos de toxinfecções alimentares no homem (SANTOS & GIL-TURNES, 2005).

Outro desafio que tem sido enfrentado pela indústria avícola é a retirada dos antimicrobianos promotores de crescimento da dieta dos animais. Segundo CASTANON (2007), o efeito de antimicrobianos como promotores de crescimento foi descoberto em 1940, quando se observou melhora de crescimento em animais alimentados com micélios de *Streptomyces aureofaciens* contendo clortetraciclina. A partir de então, os antimicrobianos, como a bacitracina, vêm sendo utilizados como promotores de crescimento na avicultura (MCEWEN & FEDORKA-CRAY, 2002).

Todavia, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação animal tem sido questionado em função do desenvolvimento de bactérias resistentes. Os consumidores aumentaram as suas exigências perante os produtos de origem animal e os blocos econômicos, principalmente a União Européia, passaram a banir o uso dos antimicrobianos na alimentação dos animais. Um dos primeiros relatos de resistência em alimentos de origem animal foi realizado por ELLIOTT & BARNES (1959), que observaram resistência à

tetraciclina em frangos de corte alimentados com antibióticos. AARESTRUP et al. (1998), em um levantamento da resistência de bactérias a agentes antimicrobianos feito na Dinamarca, mostraram resistência adquirida por bactérias a todos os agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento, com maior frequência de resistência à avilamicina, avoparcina, bacitracina, flavomicina, espiramicina, tilosina e virginiamicina. Em outro trabalho, realizado por SRIDEVI DHANARANI et al. (2009), verificou-se que de 120 grupos de bactérias isoladas em cama de frango, pelo menos um desses grupos apresentava resistência a um dos oito antimicrobianos testados, e o maior percentual de resistência (75%) observado foi para a estreptomicina.

Segundo LANGHOUT (2005), a retirada dos antimicrobianos promotores de crescimento da dieta de frangos causa um impacto negativo sobre a saúde animal, com diminuição média no desempenho das aves de 3,0 a 7,0%, além de aumento na mortalidade. Eles produzem efeitos benéficos em relação a qualidade dos produtos, pois podem controlar possíveis agentes infecciosos.

Bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas importantes patógenos veiculados por alimentos, estando amplamente distribuído na natureza por possuir um grande número de reservatórios e apresentar sorotipos inespecíficos quanto aos hospedeiros (BERSOT, 2006). REZENDE et al. (2005), avaliaram a sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* sp. isoladas de 96 carcaças de frangos e encontraram resistência bacteriana de 84,2% e 36,8% aos antibióticos tetraciclina e ampicilina, respectivamente.

Em virtude disto, a indústria avícola tem buscado alternativas ao uso dos antimicrobianos, com o objetivo de manter a mesma eficiência produtiva proporcionada pelos promotores com a produção de um alimento seguro e sem a possibilidade de induzir a resistência microbiana.

O uso terapêutico das plantas pelo homem decorre desde a Antiguidade. Os árabes na Idade Média utilizavam os óleos essenciais no embalsamamento de corpos, para a conservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, antiinflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais (BAKKALI et al., 2008).

De acordo com SARTORI et al. (2009), o termo aditivo fitogênico é o mais adequado e utilizado para a nutrição animal, pois consistem em produtos

compostos por óleos essenciais e extratos vegetais utilizados nas rações com o objetivo de melhorar o desempenho animal e substituir o uso dos antimicrobianos. Para os pesquisadores BURT (2004) e LANGHOUT (2005), a principal diferença entre extratos vegetais e óleos essenciais é o modo de obtenção ou extração. Os extratos vegetais são obtidos utilizando qualquer parte da planta, desidratando-a e moendo-a. Já os óleos essenciais são óleos voláteis extraídos de produtos vegetais por destilação a vapor d'água ou através de atividade enzimática seguida por vapor d'água.

Segundo APPLEGATE et al. (2010) o mecanismo de ação dos fitogênicos é influenciada por fatores ambientais como as condições climáticas de cultivo da planta, localização geográfica, condição de armazenamento, época de colheita, estágio de desenvolvimento e parte coletada na composição química da planta.

A análise da composição dos compostos químicos das plantas é feita por cromatografia gasosa e por espectrometria de massa. Os principais componentes químicos dos óleos essenciais e extratos vegetais são os terpenóides (linalol, geraniol, mentol, terpineol) e hidrocarbonetos de baixo peso molecular, como os fenóis (timol, carvacrol, eugenol, guaiacol) e aldeídos aromáticos (cinemaldeído, cuminal) (BRENES & ROURA, 2010).

Diversos trabalhos relatam a atividade antimicrobiana dos fitogênicos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Segundo BARRETO (2007) os óleos essenciais, por exemplo, agem especificamente, alterando a permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, o que causa interrupção de processos essenciais à célula levando à morte bacteriana. PAVEL et al. (2010), avaliando propriedades antimicrobianas de óleos essenciais isolados a partir de duas espécies silvestres de tomilho da região da Romênia (*Thymus pulegioides* L. e *Thymus glabrescens* Willd.), notaram inibição de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além da inibição do fungo *Candida albicans*. COPUR et al. (2010) compararam o processo de desinfecção de ovos de matrizes utilizando o óleo essencial de orégano como desinfetante e observaram redução do número de microrganismos. JANG et al. (2007) verificaram redução de *Escherichia coli* em frangos de corte alimentados com óleo essencial composto por timol. BEN-MAHDI et al. (2010) verificaram redução no número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Escherichia*

coli da microbiota intestinal de frangos de corte que receberam óleo essencial de tomilho na ração.

Além do efeito antibacteriano, os óleos essenciais e extratos de plantas são eficazes contra uma variedade de organismos incluindo os fungos (ADAM et al., 1998; HAMMER et al., 1999; VELLUTI et al., 2003; SARTORATTO et al., 2004; GUYNOT et al., 2005; CLEFF et al., 2008; VIEIRA, 2009), protozoários (GRABENSTEINER et al., 2008), larvas (GENDE et al., 2008) e ácaros (KIM et al., 2007; GEORGE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010; SERTKAYA et al., 2010).

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados para verificar a ação dos fitogênicos com melhoradores do desempenho animal. ERTAS et al. (2005) utilizando uma mistura de óleos essenciais de orégano, cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) e erva doce (*Pimpinella anisum* L.) observaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar em frangos de corte, comprovando que os óleos essenciais podem substituir os promotores de crescimento.

Avaliando o desempenho de frangos de corte criados em galpões com baixo desafio sanitário, TOLEDO et al. (2007) observaram melhor ganho de peso e maior taxa de viabilidade nos tratamentos que receberam uma mistura de óleos essenciais de orégano, canela, eucalipto (*Eucalyptus* spp), artemísia (*Artemisia vulgaris* L.) e trevo (*Trifolium* spp.). LEVIC et al. (2007), verificaram maior peso corporal, melhor conversão alimentar e menor mortalidade nas aves alimentadas com óleos essenciais de orégano e cravo. SILVA et al. (2010) encontraram aumento do ganho de peso, peso final e melhor conversão alimentar em frangos de corte alimentados com óleo de aroeira vermelha aos 21 dias de idade.

O uso de extratos vegetais e óleos essenciais na alimentação de frangos de corte é recente e, por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos aditivos fitogênicos sobre o desempenho, a integridade intestinal e o sistema imunológico de frangos de corte inoculados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

REFERÊNCIAS

1. AARESTRUP, F. M.; BAGER, F.; JENSEN, N. E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H. C. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 106, n. 6, p. 602-622, 1998.
2. ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Animal Feed Science and Technology**, v. 46, p. 1739-1745, 1998.
3. APPLGATE, T. J.; KLOSE, V.; STEINER, T.; GANNER, A.; SCHATZMAYR, G. Probiotics and phytochemicals for poultry: Myth or reality? **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, p. 194-210, 2010.
4. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
5. BARRETO, M. S. R. **Uso de extratos vegetais como promotores do crescimento em frangos de corte**. 2007. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
6. BEN-MAHDI, M. H. ; DJELLOUT, B. ; BOUZAGH-BELAZOUZ, T. ; YAHIAOUI, F. ; BEN-MAHDI, N. R. Intérêt de l’huile essentielle de thym dans l’amélioration des performances zootechniques et sanitaires du poulet de chair. **Livestock Research for Rural Development**, v. 22, n. 6, p. 112, 2010.
7. BERSOT, L. S. *Salmonella* no Brasil: a sua importância no abate de aves. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006, p. 90-94.
8. BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 1-14, 2010.
9. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
10. CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v. 86, p. 2466-2471, 2007.
11. CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; SCHUCH, L. F. D.; RODRIGUES, M. R. A.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Atividade *in vitro* do óleo essencial de

Origanum vulgare frente à *Sporothrix Schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 513-516, 2008.

12. COPUR, G.; ARSLAN, M.; DURU, M.; BAYLAN, M.; CANOGULLARI, S.; AKSAN, E. Use of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil as hatching egg disinfectant. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 17, p. 2531-2538, 2010.
13. ELLIOTT, S. D.; BARNES, E. M. Changes in serological type and antibiotic resistance on Lancefield group D Streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. **Journal Genetics Microbiology**, v. 20, p. 426-433, 1959.
14. ERTAS, O. N.; GÜLER, T.; ÇİFTÇİ, M.; DALKILIÇ, B.; SIMSEK, Ü, G. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 11, p. 879-884, 2005.
15. GENDE, L. B.; FLORIS, I.; FRITZ, R.; EGUARAS, M. J. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. **Bulletin of Insectology**, v. 61, n. 1, p. 1-4, 2008.
16. GEORGE, D. R.; SPARAGANO, O. A. E.; PORT, G.; OKELLO, E.; SHIEL, R. S.; GUY, J. H. Repellence of plant essential oils to *Dermanyssus gallinae* and toxicity to non-target invertebrate *Tenebrio molitor*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 129-134, 2009.
17. GRABENSTEINER, E.; LIEBHART, D.; ARSHAD, N.; HESS, M. Antiprotozoal activities determined in vitro and in vivo of certain plant extracts against *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* sp.. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1257-1264, 2008.
18. GUYNOT, M. E.; MARÍN, S.; SETÚ, L.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Screening of antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 1, p. 25-32, 2005.
19. HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1999.
20. JANG, I. S.; KO, Y. H.; KANG, S. Y.; LEE, C. Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, p. 304-315, 2007.
21. KIM, S.; NA, Y.; YI, J.; KIM, B.; AHN, Y. Contact and fumigant toxicity of oriental medicinal plant extracts against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 377-382, 2007.

22. LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: A visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. Santos, **Anais...** Santos: FACTA, 2005. p. 21-33.
23. LEVIC, J.; SREDANOVIC, S.; DURAGIC, O.; JAKIC, D.; LEVIC, L.; PAVKOV, S. New feed additives based on phytochemicals and acidifiers in animal nutrition. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 23, n. 5, p. 527-534, 2007.
24. MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 1, n. 34, supl. 3, p. S93-S106, 2002.
25. PAVEL, M.; RISTIC, M.; STEVIC, T. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 75, n. 1, p. 27-34, 2010.
26. REZENDE, C. S. M.; ANDRADE, M. A.; MESQUITA, A. J.; LINHARES, G. F. C.; MESQUITA, A. Q.; MINAFRA, C. S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte alimentados abatidos no estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p. 199-203, 2005.
27. RIBEIRO, V. L. S.; SANTOS, J. C.; BORDIGNON, S. A. L.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; POSER, G. L. V. Acaricidal properties of the essential oil from *Herperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2506-2509, 2010.
28. SANTOS, J. R. G. L.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.
29. SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
30. SARTORI, J. R.; FASCINA, V. B.; CARVALHO, F. B.; GONZÁLES, E. Atualidades em aditivos: óleos essenciais, prebióticos e probióticos. In: IX SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, **Anais...** Goiânia, 2009.
31. SERTKAYA, E.; KAYA, K.; SOYLU, S. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 107-112, 2010.
32. SILVA, M. A.; PESSOTTI, B. M. S.; ZANINI, S. F.; COLNAGO, G. L.; NUNES, L. C.; RODRIGUES, M. R. A.; FERREIRA, L. Óleos de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2151-2156, 2010.

33. SRIDEVI DHANARANI, T.; SHANKAR, C.; PARK, J.; DEXILIN, M.; KUMAR, R. RAJESH.; THAMARAISELVI, K. Study on acquisition of bacterial antibiotic resistance determinants in poultry litter. **Poultry Science**, v. 88, p. 1381-1387, 2009.
34. TOLEDO, G. S. P.; COSTA, P. T. C.; SILVA, L. P.; PINTO, D.; FERREIRA, P.; POLETTO, C. J. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibióticos e/ou fitoterápicos como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1760-1764, 2007.
35. UBABEF- **Associação Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual UBABEF 2010/2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>. Acesso em: 03 jan. 2012.
36. VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, orégano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 145-154, 2003.
37. VIEIRA, P. R. N. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporum canis***. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza

CAPÍTULO 2 - Efeitos dos aditivos fitogênicos no desempenho e na integridade intestinal de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

RESUMO: O estudo foi conduzido para avaliar a influência dos aditivos fitogênicos sobre o desempenho zootécnico e a integridade intestinal de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE). Foram utilizados 300 pintos com um dia de idade, machos, linhagem Cobb, divididos em cinco tratamentos com seis repetições cada. Tratamento 1 - grupo inoculado por via oral, com 0,1 mL de solução salina tamponada e esterilizada a 0,85% (Placebo); tratamento 2 - recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (Contr. AF); tratamento 3 - grupo inoculado via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (Contr. positivo SE); tratamento 4 - grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de SE e que recebeu como antimicrobiano promotor de crescimento (APC) a bacitracina metil dissilicato na dosagem de 55 ppm na ração até os 35 dias de idade (SE + APC); tratamento 5 - grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de SE que recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (SE + AF). Realizou-se análises de desempenho e seis aves por tratamento foram pesadas, sacrificadas e amostras foram coletadas para aferição do pH. Houve diferença significativa no peso médio e no ganho de peso dos grupos sem desafio microbiano em relação aos grupos inoculados com SE e melhor conversão alimentar no tratamento alimentado com aditivos fitogênicos. Observou-se maior altura dos vilos somente com os aditivos fitogênicos, maior relação vilo:cripta para grupo Cont. AF. Detectou-se aos 14 dias que o APC alterou o pH do cólon e do ceco. Conclui-se que os aditivos fitogênicos não controlaram os efeitos da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em frangos de corte, mas melhoraram o desempenho aos 35 dias, principalmente os valores de conversão alimentar quando comparados ao tratamento placebo.

Palavras chave: aves, conversão alimentar, morfometria intestinal, pH.

CHAPTER 2 - Effects of phytogenic additives on performance and intestinal integrity of broilers experimentally inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

ABSTRACT: The study was conducted to evaluate the influence of phytogenic additives on the performance and intestinal integrity of broilers inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). 300 day-old male Cobb chicks were divided into five treatments with six repetitions each and fed with: treatment 1 - group inoculated orally with 0.1 mL of sterile buffered saline 0.85% (placebo) treatment 2 - received phytogenic additives in the diet at the dosage of 0.10 kg / ton of feed initial 35 days of age (Contr.FA), treatment 3 - group inoculated orally with 0.5 ml of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU /0.5 mL of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Contr. positive SE) treatment 4 - group inoculated orally with 0.5 mL of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU/0.5 mL SE and received as antimicrobial growth promoter (AGP) bacitracin methylene disalicylate at a dosage of 55 ppm in the feed until 35 days of age (SE + AGP) treatment 5 - group inoculated orally with 0,5 mL of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU / mL of 0.5 SE received phytogenic additives in the feed at a dosage of 0.10 kg / ton of feed of the initial 35 days of age (SE + FA). Performance of birds was evaluated studying live weight, weight gain and feed conversion at 7, 14 and 35 days of age. At 35 days of age, six birds for treatment were weighed, sacrificed and samples were collected for measurement of pH. There were significant differences in mean weight and weight gain of groups without microbial challenge for the groups inoculated with SE and better feed additives in the treatment fed phytogenic. Observed greater villus height only phytogenic additives, higher villus:crypt to Cont group. FA. Detected at 14 days AGP change the pH of the colon and the caecum. It is concluded that the additives phytogenic not control the effects of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broilers, but improved performance at 35 days, especially the values of feed conversion when compared to placebo treatment.

Keywords: birds, feed conversion, intestinal morphometric, pH.

INTRODUÇÃO

O grande avanço da produção avícola nas últimas décadas se deve à evolução tecnológica e científica nas áreas da genética, sanidade e nutrição. Considerando que a ração representa entre 70 a 80% do custo de produção, a integridade do trato intestinal é um fator importante para o funcionamento dos mecanismos fisiológicos de digestão e absorção dos nutrientes para assegurar o bom desempenho produtivo dos lotes (FURLAN, 2010).

Além disso, o intestino funciona como uma barreira seletiva dispondo de mecanismos de defesa encontrados ao longo da superfície mucosa, constituídos de barreiras físicas, químicas e celulares, que formam um sistema de proteção intestinal prevenindo a ocorrência de doenças entéricas (BEAL et al., 2006). Dentre as doenças entéricas que podem diminuir a eficácia funcional do trato gastrointestinal (TGI) se destaca a salmonelose aviária, causada por determinados sorovares da bactéria.

A salmonelose aviária é causada pela bactéria *Salmonella* pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, com 2.610 sorovares descritos (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Esta enfermidade determina impacto econômico na avicultura podendo afetar o desempenho animal e causar morbidade e mortalidade em aves jovens. A presença da bactéria no trato digestivo das aves pode levar a contaminação da carcaça, resultando na contaminação de produtos cárneos de origem avícola (BORSOI et al., 2011). De acordo com SILVA & DUARTE (2002) e SURESH et al. (2006) sorovar Enteritidis é um dos mais envolvidos nos casos de intoxicação em humanos. O controle desta bactéria é complexo pela facilidade de disseminação, capacidade em se adaptar a diversos hospedeiros e persistir no ambiente por um longo período.

Durante anos, os antimicrobianos foram utilizados na avicultura, no entanto, o uso indiscriminado contribuiu para o aparecimento de cepas resistentes de *Salmonella* e de outras bactérias (INOUE, 2007). Em virtude disto, e por pressões econômicas, a indústria avícola tem buscado alternativas ao uso dos antimicrobianos promotores de crescimento. Neste contexto destacam os aditivos fitogênicos que compreendem, os óleos essenciais e os extratos vegetais,

produtos que potencialmente podem substituir os antimicrobianos melhoradores do crescimento.

Pesquisas com aditivos fitogênicos revelam que os mesmos quando são adicionados nas rações de frangos podem ser eficientes em melhorar a utilização dos nutrientes proporcionando melhores resultados de desempenho. Vários fatores levam ao aumento desempenho em frangos de corte. Um deles é o aumento da palatabilidade das dietas, que leva ao aumento do consumo de ração e consequente aumento do ganho de peso (CHAMBERS & GONG, 2011).

A melhora no desempenho das aves também está relacionada à atividade antimicrobiana destes aditivos que podem agir na microbiota intestinal e e ainda são pouco exploradas com fins veterinários. De acordo com GARCÍA et al. (2010), os aditivos fitogênicos reduzem os patógenos intestinais alteram a morfologia intestinal, reduzindo a altura das vilosidades e aumentando a profundidade de criptas.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos aditivos fitogênicos no controle da *Salmonella* sobre as variáveis de desempenho e integridade intestinal de frangos de corte inoculados experimentalmente, via oral, com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

2 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 Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Delineamento experimental

Foram utilizados 300 pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, divididos em cinco tratamentos, com seis repetições cada, alojados em grupos de 10 aves por unidade experimental, em um total de 30 unidades experimentais com 60 aves por tratamento. Os frangos de corte de um dia de idade foram pesados, identificados e distribuídos conforme o delineamento abaixo:

- TRATAMENTO 1: constituiu-se do grupo inoculado por via oral, com 0,1 mL de solução salina tamponada e esterilizada a 0,85% (Placebo).
- TRATAMENTO 2: constituiu-se do grupo que recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (Contr. AF).
- TRATAMENTO 3: constituiu-se do grupo inoculado via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (Contr. positivo SE).
- TRATAMENTO 4: constituiu-se do grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e que recebeu como antimicrobiano promotor de crescimento (APC), bacitracina metil dissilicato (BMD) na dosagem de 55 ppm na ração até os 35 dias de idade (SE + APC).
- TRATAMENTO 5: constituiu-se do grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis que recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (SE + AF).

As aves desafiadas e não desafiadas foram alojadas separadamente, mantendo-se a mesma ambiência, em baterias com quatro andares de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipos lineares e bandejas para retirada de excretas. As baterias foram aquecidas com uma lâmpada incandescente de 60 W por andar até os 21 dias de idade.

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida 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 Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4) e incubada a 37°C por 24h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantida a 4°C e a concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis foi ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (BORSOI et al., 2011).

A concentração foi confirmada por plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar Hektoen com posterior incubação a 37°C e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

Inoculação das aves

Com um dia de vida, antes do alojamento, utilizando seringas de 1 mL, os pintos foram inoculados, via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

Programa alimentar

O programa alimentar foi composto de duas rações experimentais, destinadas a diferentes fases de criação: inicial, 1 a 21 dias; e crescimento, 22 a 35 dias de idade (Tabela 1). As rações fornecidas aos animais, farelada à base de milho moído e farelo de soja, foram formuladas de acordo com a composição dos

alimentos e exigências nutricionais preconizadas por ROSTAGNO (2005) e fornecida a vontade durante todo o período experimental. Os aditivos fitogênicos e os APC foram adicionados à ração em substituição ao material inerte (amido), de acordo com a recomendação de cada produto.

TABELA 1 – Composição das rações experimentais fornecida aos frangos de corte durante todo o período experimental (1-35 dias de idade)

Ingredientes¹	Inicial (1-21dias)	Crescimento (22-35 dias)
Milho grão	58,590	59,519
Farelo de soja (45%)	34,562	32,603
Óleo de soja	1,727	3,049
Fosfato bicálcico	1,780	1,629
Calcário	0,818	0,775
Sal comum	0,435	0,415
L-lisina HCL	0,197	0,164
DL-metionina	0,241	0,218
L-treonina	0,046	0,024
Premix vitamínico**	0,500	0,500
Premix mineral***	0,100	0,100
Inerte (amido)	1,000	1,000
Total	100,000	100,000
Nutrientes		
Energia metabolizável (kcal/kg)	3,000	3,100
Cálcio (%)	0,884	0,824
Fósforo Disponível (%)	0,442	0,411
Sódio (%)	0,214	0,205
Lisina (%)	1,146	1,073
Metionina + cistina (%)	0,814	0,773
Metionina (%)	0,534	0,501

¹Quantidade por kg de produto

**Suplemento vitamínico - Inicial: Vit. A 20.000.000 UI, Vit. D3 5.000.000 UI, Vit. E 50.000 mg/kg, Vit. K 4.000 mg/kg, Vit. B1 5.000 mg/kg, Vit. B2 13.000 mg/kg, Vit. B6 7.000 mg/kg, Vit. B12 36.000 mg/kg, Ácido fólico 2.400 mg/kg, Ácido pantotênico 30.000 mg/kg, Niacina 84.000 mg/kg, Biotina 160 mg/kg, Selênio 600 ppm, Etoxiquin 166 mg/kg; Crescimento: Vit. A 16.000.000 UI, Vit. D3 3.800.000 UI, Vit. E 40.000 mg/kg, Vit. K 3.600 mg/kg, Vit. B1 3.600 mg/kg, Vit. B2 11.000 mg/kg, Vit. B6 5.200 mg/kg, Vit. B12 30.000 mg/kg, Ácido fólico 1.800 mg/kg, Ácido pantotênico 26.000 mg/kg, Niacina 70.000 mg/kg, Biotina 100 mg/kg, Selênio 600 ppm, Etoxiquin 166 mg/kg

***Suplemento mineral (mg/kg) - Cobre 16.250, Ferro 100.000, Manganês 150.000, Zinco 125.000, Iodo 2.000

Os aditivos fitogênicos eram partículas microencapsuladas à base de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e de alecrim (*Rosmarinus officinallis*) e extrato de pimenta vermelha (*Capsicum annuum*) e apresentaram garantias mínimas por kg de produto: 4,5g de carvacrol, 1,0 g de cinamaldeído, 2,0 g de cineol e 20 g de capsaicina.

Desempenho

Aos sete, 14 e 35 dias de idade foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Peso Médio (PM): obtido dividindo-se o peso total das aves de cada parcela, pelo número médio 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 médio de aves;
- Conversão alimentar (CA): calculada pela razão: CR/GP ;
- Mortalidade: Para análise estatística o valor em percentagem de mortalidade foi transformado em Arc seno $((\%Mort. /100)+0,05)^{0,5}$.

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

Exame histomorfométrico intestinal

Aos 14 e 35 dias de idade, seis aves por tratamento foram submetidas a um jejum de seis horas, pesadas, eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas. Fragmentos do duodeno e do jejuno foram coletados, seccionados longitudinalmente, abertos e as extremidades foram fixadas com grampos em isopor, cada peça foi acondicionada em frascos previamente identificados contendo formol tamponado a 10% para a fixação do material. Posteriormente, as peças passaram pelos processos de desidratação, clarificação e inclusão em

parafina histológica. Em seguida, os blocos de parafina contendo as peças foram seccionados a 5,0 μm em micrótomo rotativo e depois colocados em lâminas de vidro para posterior coloração pelo método de Hematoxilina Eosina (LUNA, 1968). As lâminas foram submetidas à leitura de altura de vilosidade e profundidade de cripta com auxílio do software Image J (RASBAND, 2004).

A altura do vilo foi medida usando o ápice do vilo até a base da junção do vilo com a cripta e a profundidade da cripta (UNI et al., 1998) definiu-se com a profundidade da invaginação da cripta com os vilos adjacentes. Realizaram-se cinco leituras por lâmina para altura do vilo e cinco em sequência para profundidade das criptas por fragmento de cada tecido, sempre da direita para a esquerda do corte. Também foi calculada a relação entre altura do vilo e profundidade de cripta. As imagens foram digitalizadas do microscópio óptico de campo claro (Carl Zeiss modelo JENAVAL) para o computador, através da câmara de vídeo analógica e a placa de captura.

Quantificação de pH

Também aos sete, 14 e 35 dias de idade o pH do conteúdo do ingluvívio, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon de cada ave necropsiada foi aferido na própria porção por meio de peagâmetro digital (PHTEK, modelo pH-100-B).

Análises estatísticas

Os dados quantitativos de desempenho, avaliação de pH e histomorfometria intestinal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas quando necessário pelo teste de Tukey a 5%, sendo utilizado o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System 9.2).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às variáveis de desempenho dos frangos de corte encontram-se na Tabelas 2, 3 e 4.

TABELA 2 – Peso inicial (PI), peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) e alimentados com aditivos fitogênicos no período de 1-7 dias de idade

Tratamentos	PI	PM	GP	CR	CA
Placebo	44,43	186,85	142,42	153,66	1,10
Contr. AF	44,30	183,93	139,63	151,18	1,09
Contr. positivo (SE)	44,33	182,20	137,86	149,27	1,08
SE + APC	44,56	188,26	133,70	149,27	1,11
SE + AF	44,73	183,30	138,56	151,18	1,09
P	0,2222	0,3142	0,3134	0,1250	0,7636
C. V. (%)	0,7934	3,7275	5,0003	2,0781	4,2288
EPM	0,1440	2,7835	2,8260	1,2803	0,0189

Observa-se na Tabela 2 que no período de 1-7 dias de idade não houve efeito significativo ($P>0,05$) entre os tratamentos para as variáveis de desempenho estudadas.

TABELA 3 – Peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) e alimentados com aditivos fitogênicos no período de 1-14 dias de idade.

Tratamentos	PM	GP	CR	CA
Placebo	535,78	348,92	259,09	1,24
Contr. AF	527,21	343,37	263,05	1,26
Contr. positivo (SE)	517,84	335,64	266,61	1,29
SE + APC	514,98	336,72	261,66	1,27
SE + AF	524,78	341,48	262,50	1,26
P	0,5104	0,7106	0,7977	0,8049
C. V. (%)	4,1709	5,2608	3,9390	5,1015
EPM	8,9245	7,3282	4,2226	0,0264

Do mesmo modo, os dados apresentados na Tabela 3 não demonstram diferença significativa ($P>0,05$) no período de 1-14 dias entre os

tratamentos analisados. Os tratamentos não influenciaram nos resultados, também, MOUNTZOURIS et al. (2011) não encontraram diferença significativa para as mesmas variáveis de desempenho no período de 1-14 dias de idade em frangos alimentados com óleos essenciais de orégano, laranja e erva-doce.

TABELA 4 - Peso médio (PM), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) e alimentados com aditivos fitogênicos no período de 1-35 dias de idade

Tratamentos	PM	GP	CR	CA
Placebo	2384,93a	2340,49a	3123,47	1,39ab
Contr. AF	2429,96a	2385,65a	3196,26	1,29a
Contr. positivo (SE)	2183,19b	2138,97b	3109,14	1,46b
SE + APC	2206,36b	2161,72b	3116,25	1,44ab
SE + AF	2184,55b	2139,82b	3119,93	1,49b
P	0,0034	0,0034	0,8258	0,0160
C. V. (%)	5,6335	5,7502	4,5787	7,0493
EPM	52,3864	52,4281	58,5637	0,0407

^{a,b} médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se que (Tabela 4), no período de 1-35 dias de idade, houve diferença significativa ($P < 0,05$) no peso médio e no ganho de peso dos grupos sem desafio microbiano em relação aos grupos inoculados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. Destaca-se que os maiores valores ($P > 0,05$) foram para o tratamento alimentado com aditivos fitogênicos, além de melhor conversão alimentar, os quais foram iguais ao grupo placebo. O tratamento com APC e placebo foram semelhantes quanto a conversão alimentar, sugerindo que não houve efeito do APC sobre esta variável, entretanto o GP e PM foram diferentes com melhor resultado para o placebo. Este fato pode ser atribuído ao desafio sanitário que os animais sofreram que foi suficiente para que o APC causasse efeito no desempenho das aves (FUKAYAMA et al., 2005). Esses resultados são diferentes dos resultados do estudo realizado por AL-KASSIE (2009), que observaram melhor ganho de peso e conversão alimentar em frangos de corte alimentados com óleos essenciais de tomilho e canela. Segundo BRENES & ROURA (2010), os aditivos fitogênicos estimulam secreções digestivas, tornando

o processo digestivo mais eficiente, melhorando a absorção dos nutrientes e aumentando o ganho de peso. A digestibilidade dos nutrientes pode ser melhorada com a adição de óleos essenciais e extratos vegetais nas dietas, por aumentarem a atividade de enzimas digestivas. JANG et al. (2007), observaram aumento na produção de tripsina, amilase e maltase em frangos de 35 dias de idade alimentados com óleo essencial composto por timol. Outra ação dos óleos essenciais é o estímulo à secreção pancreática de lipase nas aves, como observado por PAIM et al. (2008) ao forneceram à dieta dos frangos uma mistura de óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e pimenta. Para FRANZ et al. (2009) rações contendo aditivos fitogênicos estimulam o consumo de ração, o que também não foi observado neste trabalho.

Nas Tabelas 5 e 6, encontram-se os resultados de altura dos vilos, profundidade de criptas e relação vilo:cripta do duodeno e jejuno, respectivamente, aos 14 e 35 dias de idade.

TABELA 5 – Alturas médias dos vilos (AV), profundidade de criptas (PC) e relação vilo: cripta de duodeno e jejuno aos 14 dias de vida em frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) e alimentados com aditivos fitogênicos

Tratamentos	Duodeno		
	AV (µm)	PC (µm)	Vilo : Cripta
Placebo	958,01a	201,54	4,85ab
Contr. AF	1002,27a	191,21	5,46a
Contr. positivo (SE)	731,71b	265,88	2,87b
SE + APC	840,38ab	201,46	4,54ab
SE+ AF	815,64ab	192,63	4,66ab
P	0,0043	0,0948	0,0658
C. V. (%)	13,8634	24,3976	33,1689
EPM	49,2171	20,9708	74,2069
Tratamentos	Jejuno		
	AV (µm)	PC (µm)	Vilo : Cripta
Placebo	629,30	191,46	3,51
Contr. AF	675,45	198,47	3,84
Contr. positivo (SE)	518,86	169,49	3,27
SE + APC	579,19	189,50	3,12
SE + AF	647,50	217,34	3,28
P	0,2540	0,7728	0,8326
C. V. (%)	22,2945	32,6524	33,2888
EPM	56,0174	25,7610	0,4631

^{a,b} médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Verifica-se na Tabela 5, que aos 14 dias de idade houve maior altura de vilosidades no duodeno dos grupos placebo e controle com os aditivos fitogênicos em relação ao grupo que recebeu somente o desafio bacteriano. Como pode ser verificado na mesma Tabela, os fitogênicos não estimularam a proliferação das células intestinais apresentaram efeitos somente sobre o patógeno inoculado, mas tanto o APC quanto os fitogênicos reduziram o efeito da *Salmonella* aos 14 dias de idade na altura das vilosidades duodenais. A redução da altura das vilosidades duodenais no grupo controle positivo pode ser explicada pelo fato de patógenos intestinais como *Salmonella*, lesionarem o epitélio intestinal provocando mudanças na morfologia das vilosidades tornando-as mais curtas e as criptas mais profundas (GARCÍA et al., 2007). Esse resultado não foi suficiente para expressar o efeito sobre o desempenho das aves no período de 1-14 dias de idade.

Entretanto, pode-se especular o aumento das vilosidades duodenais que se expressou aos 14 dias, resultou em melhor desempenho das aves aos 35 dias de idade, no entanto nenhum efeito foi registrado nas medidas do jejuno. As propriedades dos aditivos fitogênicos ainda não estão totalmente exploradas, no entanto, pode-se notar que aos 35 dias o grupo que recebeu os fitogênicos teve melhor conversão alimentar (Tabela 4).

Na Tabela 5, verifica-se uma maior relação vilo:cripta do duodeno dos animais alimentados com aditivos fitogênicos sem desafio microbiano em relação ao tratamento cujas aves receberam somente o desafio bacteriano, o que indica que a adição de aditivos fitogênicos na ração aumentou a relação vilo:cripta no duodeno aos 14 dias de idade. Segundo SANTOS (2010), o aumento da relação vilo:cripta indica maior número de células intestinais com consequente melhora na absorção e digestão dos nutrientes. Já a diminuição da relação sugere vilos danificados e uma atividade proliferativa aumentada nas criptas, com a finalidade de restaurar a morfologia e a função do epitélio, que podem ser atribuídas a outros fatores, inclusive organismos patogênicos.

TABELA 6 – Alturas médias dos vilos (AV), profundidade de criptas (PC) e relação vilo: cripta de duodeno e jejuno aos 35 dias de vida em frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) e alimentados com aditivos fitogênicos

Tratamentos	Duodeno		
	AV (µm)	PC (µm)	Vilo : Cripta
Placebo	1144,9	213,70	5,72
Contr. AF	1275,0	208,39	6,44
Contr. positivo (SE)	1020,3	246,86	4,39
SE + APC	1134,9	193,10	5,88
SE + AF	1168,3	223,99	5,42
P	0,2325	0,5588	0,1968
C. V. (%)	15,8245	25,7795	26,0961
EPM	74,2096	22,8599	0,5938
Tratamentos	Jejuno		
	AV (µm)	PC (µm)	Vilo : Cripta
Placebo	772,01	201,64	3,94
Contr. AF	904,13	171,72	5,49
Contr. positivo (SE)	742,07	229,00	3,89
SE + APC	868,84	159,85	5,70
SE + AF	772,29	165,07	4,85
P	0,1115	0,2129	0,1063
C. V. (%)	14,6584	30,8045	29,5917
EPM	48,5845	23,3227	0,5773

Os dados relativos às mensurações do duodeno jejuno da Tabela 6 revelam que não houve efeito significativo ($P>0,05$) entre os tratamentos aos 35 dias de idade. No entanto, apesar de não haver diferença estatística, observa-se que maiores valores médios altura de vilo e relação vilo:cripta foram registrados nos grupos que alimentados com fitogênicos. O aumento destas variáveis explica o aumento do peso médio, ganho de peso e a melhor conversão alimentar aos 35 dias de idade, pois quanto maior a altura do vilo maior será a área de absorção de nutrientes (BOLELI et al., 2002).

Os dados referentes aos valores de pH de frangos de corte aos sete, 14 e 35 dias de idade encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7 - Valores de pH do inglúvio, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon de frangos de corte aos sete, 14 e 35 dias de idade em função dos tratamentos experimentais

Tratamentos	inglúvio	duodeno	jejuno	íleo	ceco	cólon
7 dias de idade						
Placebo	5,70	6,08	6,30	6,43	6,80	6,30
Contr. AF	5,93	6,38	6,53	6,68	6,81	6,51
Contr. positivo (SE)	5,86	6,30	6,48	6,76	6,78	6,30
SE + APC	5,95	6,01	6,16	6,35	6,78	6,20
SE + AF	5,91	6,30	6,20	6,71	6,86	6,41
P	0,1226	0,1593	0,0278	0,0963	0,8687	0,4214
C. V. (%)	2,9880	4,6230	3,5358	4,6408	2,2334	4,6917
14 dias de idade						
Placebo	5,70	6,50	6,53	6,46	7,05	6,35b
Contr. AF	5,93	6,56	6,61	6,73	6,96	6,31b
Contr. positivo (SE)	5,86	6,58	6,41	6,60	6,85	6,38b
SE + APC	5,90	6,66	6,55	6,50	7,00	6,68a
SE + AF	5,85	6,55	6,55	6,68	6,90	6,56ab
P	0,8258	0,6859	0,4676	0,1290	0,4752	0,0044
C. V. (%)	6,1554	2,9966	2,8388	3,0242	2,9379	2,6871
35 dias de idade						
Placebo	5,51	6,48	6,68	6,80	7,28a	6,58
Contr. AF	5,60	6,63	6,51	6,75	7,20ab	6,76
Contr. positivo (SE)	5,48	6,53	6,73	6,91	7,11ab	6,68
SE + APC	5,73	6,60	6,60	6,40	6,81b	6,93
SE + AF	5,88	6,41	6,31	6,65	7,01ab	6,66
P	0,2051	0,7496	0,1049	0,1052	0,0431	0,2895
C. V. (%)	5,6685	4,7259	4,1720	4,8645	3,6724	4,2012

^{a,b} médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se na Tabela 7 que o pH do trato intestinal aos sete dias de idade não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, somente aos 14 dias o pH do cólon do grupo que recebeu o APC com desafio bacteriano foi maior em relação aos tratamento sem desafio microbiano. Segundo LU et al. (2003) diversos fatores podem afetar a composição da comunidade bacteriana do TGI, tais como a idade, dieta, administração de antimicrobianos promotores de crescimento e infecção por organismos patogênicos. Possivelmente a ausência do desafio com *Salmonella* nesses grupos levou a uma maior colonização por bactérias acidófilas no cólon, com conseqüente redução do pH intestinal aos 14 dias de idade. Conforme SAMANTA et al. (2010), antimicrobianos como a bacitracina de zinco diminuem a colonização de

Lactobacillus, assim ocorrendo a elevação do pH, como se observou no cólon das aves estudadas.

Já aos 35 dias, o pH do ceco do grupo com APC e desafio bacteriano foi maior em relação ao grupo placebo. Este resultado pode ser explicado pelos os autores KNARREBORG et al. (2002) os quais mencionaram que a bacitracina reduz a populações intestinais de bactérias Gram-positivas, e que a hipótese mais aceitável para explicar os resultados encontrados de pH dados, seria a inativação das populações microbianas indígenas do ceco com a liberação de toxinas bacterianas resultando em redução do pH do ceco.

CONCLUSÕES

Os aditivos fitogênicos não controlaram os efeitos da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis mas melhoraram o desempenho aos 35 dias, principalmente os valores de conversão alimentar quando comparados ao tratamento placebo.

REFERÊNCIAS

1. AL-KASSIE, G. A. M. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 169-173, 2009.
2. BEAL, R. K.; POWERS, C.; DAVISON, T. F.; SMITH, A. L. Immunological development of the avian gut. In: PERRY, G. C. **Avian gut function in health and disease**. Oxfordshire: CABI, p. 273-338, 2006.
3. BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 75-96, 2002.
4. BORSOI, A.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. 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. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 266-273, 2011.
5. BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 1-14, 2010.
6. CHAMBERS, J. R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**, v. 44, p. 3149-3159, 2011.
7. FRANZ, C.; BASER, K. H. C.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 327-340, 2010.
8. FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KATO, R. K.; MURGAS, L. D. S. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 6, p. 2316-2326, 2005.
9. FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5, 2004, Santa Catarina, **Anais...** Santa Catarina, 2004.
10. GARCÍA, V.; CATALÁ-GREGORI, P.; HERNÁNDEZ, F.; MEGÍAS, M. D.; MADRID, J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, p. 555-562, 2007.
11. GARCÍA, V.; CATALÁ-GREGORI, P.; HERNÁNDEZ, F.; MEGÍAS, M. D.; MADRID, J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers.

- International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 89-114, 2010.
12. GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.; WEILL, F. X. Supplement 2003–2007 to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, n. 47, v. 161, p. 26–29, 2010.
 13. INOUE, A. Y. Vacinação de reprodutoras pesadas contra *Salmonella* Enteritidis: Efeitos na transmissão e contaminação da progênie. In: CONFERÊNCIA APINCO 2007 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 2007. **Anais...**Campinas: FACTA, 2007, p. 215-235.
 14. JANG, I. S.; KO, Y. H.; KANG, S. Y.; LEE, C. Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, p. 304-315, 2007.
 15. KNARREBORG, A.; SIMON, M. A.; ENGBERG, R. M.; JENSEN, B. B.; TANNOCK, G. W. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various age. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5918–5924, 2002.
 16. LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J.; LEE, M. D. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003.
 17. LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces**. Institute of Pathology. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
 18. MOUNTZOURIS, K. C.; PARASKEVAS, V.; TSIRTSIKOS, P.; PALAMIDI, I.; STEINER, T. Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, p. 223-231, 2011.
 19. PAIM, F. C.; TRAESEL, C. K.; LOPES, S. T. A.; SCHIMIDT, C.; SILVA, C. B.; WOLKMER, P. COSTA, M. M. Bioquímica sérica de frangos de corte suplementados com óleos essenciais na ração. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado, 2008.
 20. RASBAND, W.S. Image J. 2004. **National Institutes of Health**, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 20 mar. 2011.
 21. ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**; composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: Editora UFV, 2005, 141p.

22. SAMANTA, S.; HALDAR, S.; GHOSH, T. K. Comparative Efficacy of an Organic Acid Blend and Bacitracin Methylene Disalicylate as Growth Promoters in Broiler Chickens: Effects on Performance, Gut Histology, and Small Intestinal Milieu. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, 8 p., 2010.
23. SANTOS, I. I. **Efeitos de probiótico, óleos essenciais e enzimas em parâmetros produtivos e sanitários de frangos de corte**. 2010. 207 f. Tese (Doutrado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
24. SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 2, p. 85-100, 2002.
25. SURESH, T.; HATHA, A. A. M.; SCREENIVASA, D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retails markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 294-299, 2006.
26. UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Post hatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, n. 1, p. 75-78, 1998.

CAPÍTULO 3 - ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOLÓGICA DE ADITIVOS FITOGÊNICOS EM FRANGOS DE CORTE INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella enterica* SOROVAR ENTERITIDIS

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito dos aditivos fitogênicos sobre a invasão da *Salmonella* no sistema imune de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE). Foram utilizados 300 pintos com um dia de idade, machos, linhagem Cobb, divididos em cinco tratamentos com seis repetições cada. Tratamento 1 - grupo inoculado por via oral, com 0,1 mL de solução salina tamponada e esterilizada a 0,85% (Placebo); tratamento 2 – adição de aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (controle AF); tratamento 3 - grupo inoculado via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (controle positivo SE); tratamento 4 - grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de SE e que recebeu como antimicrobiano promotor de crescimento (APC) a bacitracina metil dissilicato (BMD) na dosagem de 55 ppm na ração até os 35 dias de idade (SE + APC); tratamento 5 - grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de SE que recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (SE + AF). Aos sete, 14 e 35 dias de idade, seis aves por tratamento foram submetidas a um jejum de seis horas, pesadas, sacrificadas, necropsiadas e coletados fragmentos de órgãos para exames biométricos, isolamento de *Salmonella* e contagem de linfócitos. Não houve efeito sobre a biometria dos órgãos nas idades avaliadas. *Salmonella* foi isolada com frequência variada. Houve diferença estatística entre os tratamentos para o número médio de linfócitos no baço na primeira semana. Ocorreu depleção dos linfócitos no grupo que recebeu SE+APC e na tonsila cecal no grupo controle positivo. Verifica-se que a depleção linfóide nos baços, bursas e tonsilas cecais variou de 5,1 a 28,4%, 2,0 a 42,0% e de 1,8 a 28,7%, respectivamente, com predominância de depleção linfóide discreta e moderada. Conclui-se que os fitogênicos não impedem a migração da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis para os órgãos linfóides, bem como não estimulam a proliferação de células linfóides nos frangos de corte.

Palavras chave: bacteriologia, controle, linfócitos, salmonelose aviária

CHAPTER 3 - ANTIMICROBIAL AND IMMUNOLOGICAL ACTIVITIES OF PHYTOGENIC ADDITIVES IN BROILER INOCULATED WITH *Salmonella enterica* SEROVAR ENTERITIDIS

ABSTRACT: The objective was to evaluate the effect of phytogetic additives on the invasion of *Salmonella* on the immune system of broiler chickens inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). 300 chicks day-old male Cobb were divided into five treatments with six repetitions each. Treatment 1 - group inoculated orally with 0.1 mL of sterile buffered saline and 0.85% (placebo) treatment 2 - phytogetic received additives in the feed at the dosage of 0.10 kg/ton of feed initial 35 days of age (control FA), treatment 3 - group inoculated orally with 0.5 mL of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU/ mL of 0.5 *Salmonella enterica* serovars enteritidis (control positive SE) treating 4 - group inoculated orally with 0.5 ml of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU/0.5 mL SE and received as antimicrobial growth promoter (AGP) bacitracin methylene disalicylate (BMD) at a dose of 55 ppm in the feed until 35 days of age (SE + AGP) treatment 5 - group inoculated orally with 0.5 ml of buffered saline 0.85%, containing approximately 5.0×10^5 CFU/mL of 0.5 SE received phytogetic additives in the feed at a dosage of 0.10 kg/ton of feed of the age initial until 35 days (SE + FA). Seven, 14 and 35 days of age, six birds for treatment were subjected to feed withdrawal for six hours, weighed, sacrificed, necropsied and was collected fragments of organs for biometric tests, isolation of *Salmonella* and lymphocyte count. There was no effect on the organs of biometrics in ages evaluated. *Salmonella* was isolated with varying frequency. There were statistical differences between treatments for the average number of lymphocytes in the spleen in the first week. Depletion of lymphocytes occurred in the group receiving FA + AGP and cecal tonsil in the control group. It appears that the lymphoid depletion in the spleens, bursa and caecal tonsils ranged from 5.1 to 28.4%, 2.0 to 42.0% and 1.8 to 28.7%, respectively, predominantly depleted lymphoid slight to moderate. Phytogetic additives not eliminial and prevent migration of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis to lymphoid organs, and do not stimulate the proliferation of lymphoid cells in broilers.

Keywords: bacteriology, control, lymphocytes, avian salmonellosis

INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella*, compreende bactérias Gram-negativas que se destacam por serem agentes zoonóticos que infectam humanos pelo o consumo de alimentos contaminados de origem animal. Dentre os sorovares que causam distúrbios intestinais em humanos, os mais comuns são Typhimurium e Enteritidis (BORSOI et al., 2011), que podem se alojar no intestino de aves aparentemente saudáveis, contaminarem a carcaça e serem veiculados pela a carne de frango ao homem (BERSOT, 2006).

Além das medidas tomadas para reduzir a contaminação da carcaça durante o processamento, outras abordagens têm sido utilizadas pela indústria avícola, em um esforço para reduzir fontes potenciais de contaminação da carcaça, como adições de antibióticos na dieta. Estas abordagens têm sido capazes de influenciar as comunidades intestinais bacterianas e melhorar o desempenho animal (THOMPSON et al., 2008). No entanto, uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação animal têm sido questionado em função do desenvolvimento de bactérias resistentes, e ainda por exigência dos consumidores por alimentos mais seguros, aliada às pressões dos blocos econômicos sobre os países exportadores de produtos de origem animal. Por isso, pesquisas com a inclusão de aditivos alternativos na dieta como os fitogênicos, com potencial ação antimicrobiana e ação sobre o sistema imune animal são temas para pesquisas.

Estudos têm sido conduzidos para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente a microrganismos como aquelas elaboradas por WIEST et al. (2009), que dentre 86 extratos de plantas utilizados, 50 apresentaram atividade de inibição e de inativação sobre *Salmonella* sp. *in vitro*. Também SANTURIO et al. (2007) testando óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a 20 sorovares de *Salmonella*, observaram que o primeiro apresentou maior atividade antimicrobiana em relação aos demais óleos testados.

Um dos efeitos intrínsecos mais conhecidos dos aditivos fitogênicos é a sua atividade antimicrobiana relacionada à presença de fenóis, aldeídos e alcoóis em sua composição (BAKKALI et al., 2008). Estes compostos são produzidos pela planta como elementos de defesa com ação sobre a parede celular do

microrganismo, aumentando sua permeabilidade associada com a perda de prótons e com a inibição da síntese de energia (ATP) (LANGHOUT, 2005; BAKKALI et al. 2008).

De acordo HELANDER et al. (1998), as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis ao efeito dos óleos essenciais do que as Gram-negativas. Isso pode ser explicado pelo fato das Gram-negativas possuírem uma membrana lipolissacarídica formando uma superfície hidrofílica que constitui uma barreira à ação das substâncias hidrofóbicas dos óleos essenciais. Entretanto, outros autores relataram que o óleo essencial de orégano (carvacrol), particularmente, apresenta grande potencial antimicrobiano tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas (MARINO et al., 2001; CHAUDHRY et al., 2007; BEKHECHI et al., 2008; COSTA, 2009; MARTINO et al., 2009).

Além da ação antimicrobiana, acredita-se que os aditivos fitogênicos também podem atuar no sistema imunológico das aves, pois segundo HASHEMI & DAVOODI (2012) os metabólicos secundários das plantas exercem efeito imunoestimulante nos animais. As plantas ricas em flavonóides, vitamina C e carotenóides podem melhorar a atividade de linfócitos e macrófagos, aumentando a fagocitose e estimulando a síntese de interferons (FRANKIC et al. ,2009). No entanto, os estudos sobre a ação destes produtos ainda são escassos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de uma dieta com fitogênicos a base de óleo essencial de alecrim, canela, orégano e extrato de pimenta vermelha sobre o sistema imune de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

2 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 Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Delineamento experimental

Foram utilizados 300 pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade, divididos em cinco tratamentos, com seis repetições cada, alojados em grupos de 10 aves por unidade experimental, em um total de 30 unidades experimentais com 60 aves por tratamento. Os frangos de corte de um dia de idade foram pesados, identificados e distribuídos conforme o delineamento abaixo:

- TRATAMENTO 1: constituiu-se do grupo inoculado por via oral, com 0,1 mL de solução salina tamponada e esterilizada a 0,85% (Placebo).
- TRATAMENTO 2: constituiu-se do grupo que recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (Contr. AF).
- TRATAMENTO 3: constituiu-se do grupo inoculado via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (Contr. positivo SE).
- TRATAMENTO 4: constituiu-se do grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e que recebeu como antimicrobiano promotor de crescimento (APC), a bacitracina metil dissilicato (BMD) na dosagem de 55 ppm na ração até os 35 dias de idade (SE + APC).
- TRATAMENTO 5: constituiu-se do grupo inoculado por via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/0,5 mL de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis que recebeu os aditivos fitogênicos na ração na dosagem de 0,10 kg/ tonelada de ração da fase inicial aos 35 dias de idade (SE + AF).

O programa alimentar foi composto de duas rações experimentais, destinadas a diferentes fases de criação: inicial, 1 a 21 dias; e crescimento, 22 a 35 dias de idade. As rações fornecidas aos animais, farelada à base de milho moído e farelo de soja, foram formuladas de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais preconizadas por ROSTAGNO (2005).

Os aditivos fitogênicos eram à base de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e de alecrim (*Rosmarinus officinallis*) e extrato de pimenta vermelha (*Capsicum annuum*) e apresentaram garantias mínimas de 4,5g/kg de carvacrol, 1,0 g/kg de cinamaldeído, 2,0 g/kg de cineol e 20 g/kg de capsaicina.

As aves desafiadas e não desafiadas foram alojadas separadamente, mantendo-se a mesma ambiência, em baterias com quatro andares de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipos lineares e bandejas para retirada de excretas. As baterias foram aquecidas com uma lâmpada incandescente de 60 W por andar até os 21 dias de idade.

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida 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 Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4) e incubada a 37°C por 18-20h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantida a 4°C e a concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis foi ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (BORSOI et al., 2011).

A concentração foi confirmada por plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar Hektoen com posterior incubação a 37°C e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

Inoculação das aves

Com um dia de vida, antes do alojamento, utilizando seringas de 1 mL, os pintos foram inoculados, via oral, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

Exame biométrico de órgãos

Aos sete, 14 e 35 dias de idade, seis aves por tratamento foram pesadas, após 6 horas de jejum foram eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas. O peso da ave, do intestino delgado, baço e bursa foram considerados para cálculo do peso relativo do órgão/100g peso vivo da ave $\times 100$ (GRIEVES,1991).

Pesquisa de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

Também aos sete, 14 e 35 dias de idade, o conteúdo de ingluvío fragmentos da bursa, baço e tonsila cecal de seis aves por tratamento foram coletados assepticamente para análise bacteriológica. Aproximadamente um grama dos fragmentos dos órgãos coletados foi transferido para água peptonada e incubados a 37°C/24h.

Após a incubação das amostras por 18-24 horas, alíquotas de 1,0 mL da água peptonada foram transferidas para o caldo selenito cistina e 0,1 mL para o caldo Rappaport *Vassiliadis* e incubados a 41°C por 24 horas. Após o enriquecimento seletivo, de cada cultura foram feitos repiques nos ágar verde brilhante e XLT4 e incubadas a 37°C/24h. De cada um dos ágar foram selecionadas três a cinco Unidades Formadoras de Colônias (UFC) sugestivas da bactéria e repicadas em ágar tríplice açúcar-ferro (TSI), seguindo-se incubação a 37°C/24h. As amostras bacterianas que apresentaram reações e características compatíveis as do gênero *Salmonella* foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: produção de indol, produção de H₂S, urease, descarboxilação da lisina, vermelho de metila (VM), utilização do malonato e motilidade.

Contagem de linfócitos em órgãos linfóides

Foram coletados fragmentos do baço e bursa aos sete, 14 e 35 dias e fragmentos de tonsila cecal aos 14 e 35 dias de idade. Os fragmentos foram acondicionados em formalina neutra a 10%, e posteriormente submetidos às seguintes etapas de fixação, clivagem, desidratação, clareamento, impregnação, inclusão, montagem e coloração pela hematoxilina-eosina (HE) (LUNA, 1968).

Foram capturadas imagens de 15 campos de cada um dos fragmentos de baço, bursa e tonsila cecal de cada animal, para a posterior contagem dos linfócitos, realizada com o auxílio do *software* Image J. Um retículo quadrangular composto por 25 pontos foi sobreposto à imagem histológica digital e apenas foram contados os linfócitos nas intersecções presentes no campo visual. Os linfócitos contados no baço, bursa e tonsila cecal foram classificados quanto ao grau de depleção e classificados em discreto, moderado e acentuado. Preliminarmente, foi realizada a contagem dos linfócitos no baço, bursa e tonsila cecal do grupo placebo para efeito de comparação e referência na determinação do grau de depleção linfóide nos órgãos dos animais inoculados. Os graus de depleção linfóide dos órgãos foram classificados segundo a intensidade discreta, moderada e acentuada (Quadro 1).

QUADRO 1 - Graus de depleção linfóide de acordo com os percentuais obtidos pelas médias das contagens dos grupos inoculados em relação ao grupo controle

Escores	Graus de depleção linfóide	Percentual de depleção linfóide
1	Discreta	Menos de 10% de depleção linfóide
2	Moderada	Entre 10 e 30% de depleção linfóide
3	Acentuada	Acima de 30% de depleção linfóide

Análises estatísticas

Os dados de contagem de linfócitos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis (SAMPAIO, 2002). Para avaliar a frequência de *Salmonella enterica sorovar Enteritidis* foi empregado o teste não paramétrico do qui-quadrado (χ^2).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os dados referentes ao peso relativo do baço, bursa e intestino delgado aos sete, 14 e 35 dias de idade.

TABELA 1 - Valores de peso relativo (g /100g peso vivo da ave x 100) de órgãos de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) e alimentados com aditivos fitogênicos aos sete, 14 e 35 dias de idade

Tratamentos	Baço (g)	Bursa (g)	Int. del. (g)	Int. del. (cm)
7 dias de idade				
Placebo	0,11	0,17	7,26	0,1501
Contr. AF	0,08	0,22	7,33	0,1617
Contr. positivo (SE)	0,09	0,19	7,51	0,1698
SE + APC	0,09	0,20	7,31	0,1555
SE + AF	0,09	0,20	7,58	0,1518
P	0,7767	0,4637	0,8723	0,5765
C. V. (%)	39,8655	22,7786	8,3430	14,5865
14 dias de idade				
Placebo	0,09	0,21	5,54	0,2193
Contr. AF	0,09	0,25	7,09	0,2969
Contr. positivo (SE)	0,10	0,23	5,83	0,2621
SE + APC	0,08	0,26	5,82	0,2846
SE + AF	0,09	0,25	6,52	0,2957
P	0,6854	0,6412	0,6928	0,4717
C. V. (%)	26,0958	23,4728	33,4769	30,8470
35 dias de idade				
Placebo	0,10	0,20	2,91	0,4123
Contr. AF	0,09	0,21	2,46	0,3672
Contr. positivo (SE)	0,09	0,20	2,52	0,3410
SE + APC	0,09	0,18	2,80	0,3470
SE + AF	0,09	0,15	2,54	0,3419
P	0,7643	0,2127	0,3806	0,1752
C. V. (%)	23,9580	24,1470	17,1946	15,5026

AF: aditivos fitogênicos; SE: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis; APC: antimicrobiano promotor de crescimento.

Não houve efeito significativo ($p>0,05$) sobre a biometria dos órgãos aos sete, 14 e 35 dias de idade, o que indica que os aditivos fitogênicos não tiveram efeitos sobre o peso dos órgãos em relação aos demais tratamentos. Estes resultados estão de acordo com JANG et al. (2007) ao não observarem diferença significativa sobre a biometria intestinal de frangos de corte alimentados com óleo essencial composto por timol. De acordo com VOGT (2005), o peso de órgãos linfóides reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante a resposta imune. O aumento no peso de órgãos linfóides como o baço e

a bursa, indica resposta ao estímulo antigênico, o que não foi possível observar em nenhum dos tratamentos. Acrescenta-se, ainda, que a primeira semana de vida da ave é um período de rápida expansão da população de linfócitos (órgãos linfóides) e eventos que produzem clones de linfócitos que mediam o desempenho imune (RUTZ et al., 2004).

Na Tabela 2 encontram-se os dados referentes ao isolamento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em órgãos de frangos de corte.

TABELA 2 - Frequência de isolamento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) em ingluvío, tonsila cecal, baço e bursa de frangos de corte alimentados com aditivos fitogênicos aos sete, 14 e 35 dias de idade

	Placebo	Contr. AF	Contr. positivo (SE)	SE + APC	SE + AF
Inglúvio					
7 dias	- (0/6)	- (0/6)	50%(3/6)	33,3%(2/6)	66,7%(4/6)
14 dias	- (0/6)	- (0/6)	16,7%(1/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)
35 dias	- (0/6)	- (0/6)	- (0/6)	- (0/6)	- (0/6)
Total	- (0/18)	- (0/18)	22,22%(4/18)	16,66%(3/18)	33,33 %(6/18)
Tonsila cecal					
7 dias	- (0/6)	- (0/6)	83,3%(5/6)	66,7%(4/6)	66,7%(4/6)
14 dias	- (0/6)	- (0/6)	66,7%(4/6)	50%(3/6)	50%(3/6)
35 dias	- (0/6)	- (0/6)	16,7%(1/6)	- (0/6)	- (0/6)
Total	- (0/18)	- (0/18)	55,55%(10/18)	38,88%(7/18)	38,88%(7/18)
Baço					
7 dias	- (0/6)	- (0/6)	16,7%(1/6)	50%(3/6)	83,3%(5/6)
14 dias	- (0/6)	- (0/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)	66,7%(4/6)
35 dias	- (0/6)	- (0/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)	16,7%(1/6)
Total	- (0/18)	- (0/18)	16,66%(3/18)	55,55%(10/18)	55,55%(10/18)
Bursa					
7 dias	- (0/6)	- (0/6)	50%(3/6)	33,3%(2/6)	83,3%(5/6)
14 dias	- (0/6)	- (0/6)	33,3%(2/6)	16,7%(1/6)	50%(3/6)
35 dias	- (0/6)	- (0/6)	- (0/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)
Total	- (0/18)	- (0/18)	27,77%(5/18)	22,22%(4/18)	55,55%(10/18)

- : 0%

AF: aditivos fitogênicos; SE: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis; APC: antimicrobiano promotor de crescimento.

Observa-se na Tabela 2, que o grupo placebo e o grupo controle com aditivos fitogênicos não apresentaram isolamento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em nenhuma das idades avaliadas. Nos demais tratamentos *Salmonella* foi recuperada aos sete, 14 e 35, com frequência variada, ($p>0,05$), em relação ao tratamento que recebeu o inóculo bacteriano, indicando que nem APC e nem AF tiveram influência sobre a capacidade de invasão e persistência

do patógeno na bursa, no baço e tonsila cecal, portanto a infecção persistiu nestes órgãos, entretanto diminuiu com a idade. A detecção do patógeno nos órgãos linfóides se manteve até 35 dias. Observou-se que *Salmonella* invadiu a mucosa intestinal, tonsilas cecais e placas de Peyer e ser fagocitada por macrófagos. Mesmo assim, a bactéria manteve-se nos órgãos e disseminou-se para outros órgãos por meio da corrente sanguínea ou pelo sistema linfático (KABIR, 2010).

Verifica-se, ainda, na Tabela 2 que aos 35 dias a bactéria não foi mais isolada do ingluvío em nenhum dos tratamentos. Neste caso, a bactéria provavelmente não se encontrava no trato gastrintestinal (TGI) das aves e os animais ficaram no isolamento onde não havia cama para ser ingerida, situação comum aos jejuns prolongados. Além disso, segundo DURANT et al. (2000), a retirada da alimentação altera o ambiente do lúmen do ingluvío, com redução da população de *Lactobacillus*, aumento do pH e com aumento da colonização por bactérias Gram-negativas como a *Salmonella*.

Os dados referentes aos sinais clínicos verificados em frangos de corte encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3 - Sinais clínicos observados em frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) via oral

Sinais clínicos	Tratamentos		
	Contr. positivo (SE)	SE+APC	SE+AF
Mortas sem sinais	0/60 (0%)	0/60 (0%)	1/60 (1,66%)
Cloaca com sujidades	35/60 (58,33%)	30/60 (50%)	22/60 (36,66%)
Emplastramento de cloaca	23/60 (38,33%)	10/60 (16,66%)	15/60 (25%)

AF: aditivos fitogênicos; SE: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis; APC: antimicrobiano promotor de crescimento.

Nota-se que o tratamento controle positivo apresentou maior percentual de aves com sinal clínico de cloaca suja e emplastrada, o que está de acordo com a taxa de isolamento de *Salmonella* (Tabela 2) que foi maior nesse tratamento.

Durante o período experimental, os sinais foram desaparecendo com o aumento da idade da ave, sugerindo que as barreiras naturais do organismo

tentaram eliminar o patógeno. De acordo com NURMI & RANTALA (1973), BAILEY (1988) e BARNES et al. (2003), a susceptibilidade das aves à colonização intestinal por *Salmonella* é maior durante os primeiros dias de idade e logo depois é reduzida à medida que há o desenvolvimento da microbiota intestinal normal, sendo que o seu estabelecimento ocorre entre a terceira e sexta semanas de idade. Também, segundo DESMIDT et al. (1998), ocorre o desenvolvimento natural do sistema imune da ave que é um mecanismo de resistência idade-dependente.

Apenas uma ave do grupo alimentado com aditivos fitogênicos e com desafio bacteriano veio a óbito sem manifestar sinal clínico. A ave foi necropsiada e não se observou nenhuma alteração e nem se isolou *Salmonella* dos órgãos.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados de contagem de linfócitos em órgãos linfóides aos 7, 14 e 35 dias de idade.

TABELA 4 - Número de linfócitos no baço, bursa e tonsila cecal de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

Tratamentos	Baço		
	7 dias	14 dias	35 dias
Placebo	14,67±1,63a	16,67±2,42	16,33±3,14
Contr. AF	13,50±1,87ab	14,33±1,75	15,50±3,73
Contr. positivo (SE)	12,83±1,72abc	14,00±3,63	13,67±2,80
SE + APC	11,00±1,09bc	15,50±4,85	13,67±4,18
SE + AF	10,50±1,87c	12,67±3,01	15,17±3,43
P	0,0010	0,3090	0,4227
C. V. (%)	13,3066	22,6029	21,7478
Tratamentos	Bursa		
	7 dias	14 dias	35 dias
Placebo	16,67±1,86a	15,17±3,31	16,67±3,93
Contr. AF	15,50±1,22ab	13,83±2,40	16,33±3,14
Contr. positivo (SE)	12,83±2,23bc	13,33±1,63	13,67±4,18
SE + APC	13,50±2,59ab	13,83±1,60	13,17±2,64
SE + AF	9,67±1,37c	12,33±1,03	15,50±3,39
P	<0,0001	0,2747	0,3295
C. V. (%)	14,1090	15,6665	23,2332
Tratamentos	Tonsila cecal		
	7 dias	14 dias	35 dias
Placebo	-	19,16±1,72a	18,50±1,87
Contr. AF	-	18,17±2,93ab	18,17±2,14
Contr. positivo (SE)	-	13,67±3,08c	16,00±2,19
SE + APC	-	14,83±2,64bc	16,00±2,75
SE + AF	-	16,83±1,94abc	16,83±4,07

P	0,0046	0,3642
C. V. (%)	15,2374	15,9153

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

AF: aditivos fitogênicos; SE: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis; APC: antimicrobiano promotor de crescimento.

Verifica-se que aos sete dias de idade houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o número médio de linfócitos no baço. Os grupos controles apresentaram número de linfócitos superiores àqueles em que *Salmonella* estava associada aos APC e aos aditivos fitogênicos. Estes resultados para quantidade de linfócitos no baço apresentaram efeitos semelhantes nos dois aditivos.

Observou-se neste estudo redução das células linfocíticas do baço nos tratamentos com *Salmonella* e aditivos, o que se respalda em ZUANON et al. (1998), os quais mencionaram que os promotores de crescimento causam redução do número de células inflamatórias em decorrência de uma resposta imunológica menos intensa frente a um desafio microbiano.

Na bursa foi registrado maior número de linfócitos para os grupos placebo e, enquanto, o grupo que recebeu o inóculo bacteriano juntamente com os aditivos fitogênicos apresentou redução de células linfocíticas ($p > 0,05$). Os fitogênicos não alteraram a contagem da população de linfócitos da bursa, aos sete dias de idade. Por outro lado, o APC, por um mecanismo desconhecido reduziu o efeito do patógeno inoculado, considerando que não apresentou diferença significativa na contagem de linfócitos em relação ao grupo placebo. Aos 14 e 35 dias de idade, não houve diferença ($p > 0,05$), entre os grupos analisados para a contagem de linfócitos da bursa e no baço. Portanto, a depleção de linfócitos foi transitória e deve ser ressaltado que a bursa é um órgão indispensável ao desenvolvimento e funcionamento dos órgãos linfóides secundários, pois nela ocorre o processo de maturação dos linfócitos B (GLICK, 1986).

Já para a contagem de linfócitos na tonsila cecal, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) somente aos 14 dias de idade do grupo placebo em relação ao grupo controle positivo. Estes dados estão sustentados na taxa de isolamento de *Salmonella* (Tabela 2) que foi maior para baço e bursa no grupo com *Salmonella* e alimentados com fitogênicos e para tonsila cecal no grupo que

recebeu somente o patógeno. Neste órgão, de todos os tratamentos com *Salmonella*, o que recebeu os fitogênicos foi o que apresentou maior contagem linfocitária sugerindo que o aditivo fitogênico estimulou continuamente a produção de linfócitos. Isto ocorreu provavelmente pelo estímulo local do aditivo fitogênico no trato gastrointestinal.

Observa-se, ainda, que foram encontradas menores quantidades de linfócitos no baço, bursa e tonsila cecal das aves inoculadas com *Salmonella* em relação aos animais do grupo placebo e controle com os aditivos fitogênicos. Segundo FREITAS NETO et al. (2007), a diminuição da população de linfócitos é comum em respostas inflamatórias agudas, como as infecções causadas por *Salmonella*. Isso ocorre visto que mediadores inflamatórios estimulam a migração de heterófilos e linfócitos do sangue e tecidos para o local da inflamação.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados percentuais de depleção e os graus de depleção em órgãos linfóides aos 7, 14 e 35 dias de idade.

TABELA 5 - Valores médios dos percentuais de depleção linfóide em relação ao grupo placebo e seus respectivos graus de depleção no baço, bursa e tonsila cecal de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

Baço	Contr. AF		Contr. positivo (SE)		SE + APC		SE + AF	
	% DL	G	% DL	G	% DL	G	% DL	G
7 dias	8,0	D	12,5	M	25,0	M	28,4	M
14 dias	14,0	M	16,0	M	7,0	D	24,0	M
35 dias	5,1	D	16,3	M	19,4	M	7,1	D
Bursa	Contr. AF		Contr. positivo (SE)		SE + APC		SE + AF	
	% DL	G	% DL	G	% DL	G	% DL	G
7 dias	7,0	D	23,0	M	19,0	M	42,0	A
14 dias	8,8	M	12,1	M	8,8	D	18,7	M
35 dias	2,0	D	18,0	M	21,0	M	7,0	D
Tonsila cecal	Contr. AF		Contr. positivo (SE)		SE + APC		SE + AF	
	% DL	G	% DL	G	% DL	G	% DL	G
7 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
14 dias	5,2	D	28,7	M	22,6	M	12,2	M
35 dias	1,8	D	13,5	M	13,5	M	9,0	D

DL - depleção linfóide. G-graus de depleção linfóide; D – Discreta; M – Moderada; A – Acentuada. AF: aditivos fitogênicos; SE: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis; APC: antimicrobiano promotor de crescimento.

Observa-se (Tabela 5) que a depleção linfóide nos baços, bursas e tonsilas cecais variou de 5,1 a 28,4%, 2,0 a 42,0% e de 1,8 a 28,7%, respectivamente, com predominância de depleção linfóide discreta e moderada. Notou-se, ainda na mesma Tabela, grau de depleção acentuada somente para bursa aos sete dias no grupo com o inóculo e com fitogênicos, que está coerente com os dados de frequência de isolamento de *Salmonella* (Tabela 2), no entanto com a idade, o grau passou de moderado a discreta. O aditivo fitogênico não impediu o desenvolvimento do patógeno.

De acordo com FREITAS NETO et al. (2007), os linfócitos são células que, em processos inflamatórios agudos, respondem a mediadores químicos e passam da corrente circulatória e tecidos linfóides ao local da inflamação, sendo que a intensidade da linfopenia reflete, muitas vezes, a gravidade da resposta inflamatória. Os linfócitos reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos, constituindo a primeira linha de defesa contra infecções causadas por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SHEELA et al., 2003).

Como observado no baço, bursa e tonsila cecal, a infecção precoce por salmonelas pode provocar uma depleção transitória de linfócitos em órgãos linfóides e, segundo HASSAN & CURTIS (1994), pode favorecer o desenvolvimento do estado portador nas aves.

CONCLUSÕES

Os aditivos fitogênicos não impedem a migração da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis para os órgãos linfóides, bem como não estimulam a proliferação de células linfóides nos frangos de corte.

REFERÊNCIAS

1. BAILEY, J. S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v. 67, p. 928-932, 1988.
2. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
3. BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**, 11 ed., Ames, Iowa: Iowa States Press, p.631-656, 2003.
4. BEKHECHI, C.; ATIK-BEKKARA, F.; ABDELOUAHID, D. E. Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. **Phytothérapie**, v. 6, p. 153-159, 2008.
5. BERSOT, L. S. *Salmonella* no Brasil: a sua importância no abate de aves. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006, p. 90-94.
6. BORSOI, A.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. 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. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 266-273, 2011.
7. CHAUDHRY, N. M. A.; SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against Gram negative bacilli. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 609-613, 2007.
8. COSTA, A. C. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Cinnamomum zeylanicum* B. contra bactérias multirresistentes**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
9. DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; MAST, J.; GODDEERIS, B. M.; KASPERS, B.; HALSEBROUCK, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type four infection in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 63, p. 355-367, 1998.
10. DURANT, J. A.; CORRIER, D. E.; STANKER, L. H.; RICKE, S. C. *Salmonella* enteritidis hla gene fusion response after incubation in spent media from either *S. Enteritidis* or a poultry *Lactobacillus* strain, **Journal of Environmental Science and Health**, v. 35, p. 599-610, 200.
11. FRANKIC, T.; VOLJC, M.; SALOBIR, J.; REZAR, V. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 94, n. 2, p. 95-102, 2009.

12. GLICK, B. Immunophysiology. In: SURKIE, P. D. **Avian Physiology**, 4 ed., Tennessee:Kingsport Press, 685p.
13. GRIEVES, D. B. Inmunologia aviar y aplicaciones prácticas. In: XX Congreso Latino Americano de Avicultura. 1991, Quito, Ecuador. **Anais...** Quito:ACA, 1991, p. 1-6.
14. HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal Plants as New Immuno-stimulator in Poultry Industry: A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2012.
15. HASSAN, J. O.; CURTISS, R. Development and evaluation of oral vaccination program using live avirulent *Salmonella* Typhimurium to protect vaccinated chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5519- 5527, 1994.
16. HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; WRIGHT, A. V. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.
17. JANG, I. S.; KO, Y. H.; KANG, S. Y.; LEE, C. Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, p. 304-315, 2007.
18. KABIR, S. M. L. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89-114, 2010.
19. LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: A visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. Santos, **Anais...** Santos: FACTA, 2005. p. 21-33
20. LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces**. Institute of Pathology. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
21. MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195, 2001.
22. MARTINO, L.; FEO, V.; NAZZARO, F. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven *Lamiaceae* essential oils. **Molecules**, v. 14, p. 4213-4230, 2009.
23. NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.

24. ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**; composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: Editora UFV, 2005, 141p.
25. RUTZ, F.; BERMUDEZ, V. L.; PAN, E. A.; FISCHER, G. Impacto da nutrição vitamínica sobre a resposta imunológica das aves. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 3., 2002, Chapecó, **Anais..** Chapecó, 2002, p. 1-15.
26. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221 p.
27. SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* entérica de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.
28. SHEELA, R. R.; BABU, U.; MU, J.; ELANKUMARAN, S.; BAUTISTA, D. A.; RAYBOURNE, R. B.; HECKERT, R. A.; SONG, W. Immune responses against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, p. 670-679, 2003.
29. THOMPSON, K.; BURKHOLDER, K.; PATTERSON, J.; APPLGATE, T. J. Microbial Ecology Shifts in the Ileum of Broilers During Feed Withdrawal and Dietary Manipulations. **Poultry Science**, v. 87, p. 1624-1632, 2008.
30. VOGT, L. K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 106 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
31. WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C.; AVANCINI, C. A. M.; GONÇALVES, A. R. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 119-127, 2009.
32. ZUANON, J. A. S.; FONSECA, J. B.; ROSTAGNO, H. S.; SILVA, M. A. Efeito de promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 5, p. 999-1005, 1998.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avicultura industrial consolidou-se como uma fonte de proteína barata para o homem. Nos últimos anos, esta atividade tem alcançado excelentes resultados na produção de frangos de corte em decorrência de vários fatores. Entre eles, pode ser apontada a utilização de antimicrobianos promotores de crescimento na dieta de frangos de corte.

Os antibióticos agem interferindo no metabolismo das bactérias de diferentes maneiras aumentando a capacidade de absorção. Com as possíveis implicações em saúde pública pelo uso potencial de incorporar resíduos aos produtos e produzir pressão seletiva, favorecendo o aparecimento de microrganismos resistentes, muitos aditivos têm sido utilizados para controlar agentes nocivos aos processo de digestão e absorção de nutrientes.

Neste estudo, utilizou-se aditivos fitogênicos como alternativa aos antimicrobianos promotores de crescimento, na tentativa de controlar a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis buscando melhoria sanitária nos plantéis avícolas e segurança alimentar para o homem.

A partir do estudo realizado, constatou-se que os aditivos fitogênicos, na concentração utilizada, não controlaram os efeitos da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em frangos de corte como expresso nos dados de desempenho e histomorfométricos do intestino, no entanto, não impediu a migração da *Salmonella* para os órgãos linfóides. Portanto, necessita-se de mais estudos para elucidar a ação dos fitogênicos em aves com desafio sanitário.