Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Influência do jejum alimentar, probióticos e antibiótico na população de enterobactérias, bactérias ácido lácticas, *Bacillus* e *Salmonella* sp. em cecos e papos de frangos de corte

Aline Brigato Abreu da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba

2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Aline Brigato Abreu da Silva
Engenheira de Alimentos

Influência do jejum alimentar, probióticos e antibiótico na população de enterobactérias, bactérias ácido lácticas, *Bacillus* e *Salmonella* sp. em cecos e papos de frangos de corte

Orientador:
Prof. Dr. ERNANI PORTO

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Aline Brigato Abreu da
Influência do jejum alimentar, probióticos e antibiótico na população de enterobactérias, bactérias ácido lácticas, *Bacillus* e *Salmonella* sp. em cecos e papos de frangos de corte / Aline Brigato Abreu da Silva. - - Piracicaba, 2006.
53 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Contaminação de alimentos 2. Frangos de corte 3. Probiótico I. Título

CDD 664.93

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram possível a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Aos meus pais, pelo apoio e carinho incondicionais, e à minha irmã, minha eterna amiga, as pessoas que eu mais amo.

Ao professor Ernani, pela paciência, direção e por todo o aprendizado desses 2 anos e meio.

À professora Carmen, por ser sempre prestativa e atenciosa.

À empresa Korin, por ter fornecido os frangos e as instalações para a realização do projeto.

Ao pessoal do Laboratório de Laticínios, todos os que passaram por lá e de alguma forma se relacionaram comigo, ajudando no trabalho ou simplesmente proporcionando boa conversa, principalmente Bruna, Ligia, Ju, Vanessa, Susana, Gabriola, Naiane. À Carol, também do laboratório, com certeza não haveria melhor companhia para os dois anos de trabalho, além de toda a ajuda que me deu sempre que precisei, um agradecimento mais que especial.

À Denise, técnica do laboratório, pela ajuda desde o primeiro dia em que passou a estar conosco.

Às ‘carmencetes’, que me acolheram como agregada e me ajudaram nas idas ao abatedouro, principalmente Ana, Laynkza, Brioxe, Potra e Ligianne, além dos meninos Ivan e Eric.

Aos professores do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição e aos demais funcionários do departamento.

Aos meus amigos de toda a vida, que me acompanharam pela trajetória do ensino fundamental até aqui, e aos que eu conheci enquanto percorria este caminho e se tornaram igualmente importantes: Marcela, Charline, Carol, Rafa, Ana, Mari, Pedro.

À minha melhor amiga Larica, que me agüenta há 20 anos, e à sua família, que é para mim como a minha segunda família, pessoas especiais.

E por último, mas não menos importante, agradeço ao Gustavo, pelo apoio durante a elaboração do trabalho, e tudo o mais que não caberia explicar aqui.

SUMÁRIO

RESUMO..... 5
ABSTRACT..... 6
1 INTRODUÇÃO..... 7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 9
2.1 Jejum alimentar..... 9
2.2 Conteúdo intestinal e contaminação no abatedouro..... 10
2.3 Microbiota do papo e do ceco..... 11
2.4 Enterobactérias e *Salmonella*..... 13
2.5 Aditivos presentes nas rações..... 15
2.5.1 Antibióticos..... 16
2.5.2 Probióticos..... 17
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 21
3.1 Primeira Fase..... 21
3.1.1 Processo na granja e no abatedouro..... 21
3.1.2 Análises..... 21
3.2 Segunda Fase..... 25
3.2.1 Processo no galpão e no abatedouro..... 28
3.2.2 Análises..... 28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 30
4.1 Primeira Fase..... 30
4.1.2 Enterobactérias..... 30
4.1.3 *Salmonella*..... 35
4.2 Segunda Fase..... 37
4.2.1 Enterobactérias..... 37
4.2.2 *Salmonella*..... 40
4.2.3 Bactérias Ácido Lácticas..... 40
4.2.4 Esporos de *Bacillus subtilis*..... 42
5 CONCLUSÕES..... 47
REFERÊNCIAS..... 48

RESUMO

Influência do jejum alimentar, probióticos e antibiótico na população de enterobactérias, bactérias ácido lácticas, *Bacillus* e *Salmonella* sp. em cecos e papos de frangos de corte

No presente trabalho foram realizadas análises de enterobactérias e *Salmonella* em cecos e papos de frangos de corte criados sem reaproveitamento de cama e com baixa densidade, submetidos a períodos de jejum de 3, 6, 9, 12, 15 e 18 horas; também foram feitas análises das mesmas bactérias, incluindo esporos de *Bacillus subtilis* e bactérias ácido lácticas em papos e cecos de frangos de corte alimentados com probióticos (bactérias lácticas, Bokashi e esporos de *B. subtilis*) e antibiótico (bacitracina de zinco) nas rações. Não houve diferença significativa entre as populações de enterobactérias nos períodos de jejum analisados, e não foram isoladas cepas de *Salmonella* nos diferentes tratamentos. Houve diminuição significativa na população de enterobactérias nos cecos em relação ao grupo controle quando os frangos foram alimentados com bactérias ácido lácticas nas rações. Com Bokashi e antibiótico nas rações, a população de enterobactérias nos cecos foi maior que no grupo controle. Nos papos, não houve diferença significativa entre as populações de enterobactérias para os diferentes tratamentos, mas o tratamento com Bokashi foi o que obteve menor população das enterobactérias nesse habitat. As contagens de bactérias ácido lácticas e esporos de *B. subtilis* dos cecos e papos analisados não sofreram alteração significativa devido aos diferentes aditivos presentes nas rações, quando comparadas ao grupo controle. Novamente não foram isoladas cepas de *Salmonella* nos cecos e papos dos frangos analisados. A ausência de *Salmonella* pode ter explicação no modo de criação dos frangos, com baixa densidade (12 aves/m^2) e sem reaproveitamento de cama, pois foi um resultado encontrado nas duas fases do trabalho. A diminuição de enterobactérias nos cecos por parte das bactérias ácido lácticas administradas na ração pode ter sido devido à exclusão competitiva, apesar da população dessas bactérias não ter aumentado significativamente neste habitat. O tratamento com administração de Bokashi obteve menor contagem de enterobactérias no papo possivelmente devido ao fato de ser um produto fermentado, com pH baixo, que poderia agir prontamente no papo. A administração de esporos de *B. subtilis* não surtiu efeito nas populações das bactérias analisadas nos cecos e papos dos frangos de corte.

Palavras-chave: Frango de corte, jejum alimentar, probiótico, enterobactérias, *Salmonella.*

ABSTRACT

Influence of feed withdrawal, probiotics and antibiotic on the enterobacteria, lactic acid bacteria, *Salmonella* and *Bacillus* populations in the crop and caeca of broiler chickens

This study analyzed the population of enterobacteria and *Salmonella* in the crop and caeca of broiler chickens submitted to 3, 6, 9, 12, 15 and 18 hours of feed withdrawal, and raised without reutilization of the litter, in low density. The same bacteria were analyzed, plus *Bacillus subtilis* spores and lactic acid bacteria, in the crop and caeca of broiler chickens fed rations with probiotics (lactic acid bacteria, Bokashi and *B. subtilis* spores) and antibiotic (zinc bacitracin). There were no significant differences between enterobacteria populations on the analyzed withdrawal periods, and *Salmonella* strains were not isolated. There was a significant decrease at the caeca enterobacteria population compared with the control group when the broiler chickens were fed rations with lactic acid bacteria. In rations with Bokashi and antibiotic, caeca enterobacteria population was higher than that found in control group. In the crops, there were no significant difference between enterobacteria populations at the different treatments analyzed, but treatment given Bokashi had the lower counting of enterobacteria in this habitat. Lactic acid bacteria and *B. subtilis* spores populations from the caeca and crops of analyzed broiler chickens did not differ from the control group when the different additives were fed through the ration. Again there were no *Salmonella* isolates in the analyzed crop and caeca. The absence of Salmonella may have an explanation on the way that chickens were raised, with low density (12 birds/m^2) and no litter reutilization, because this result was found on the two phases of the study. The lower caeca enterobacteria population found when the broilers were fed lactic acid bacteria may have been due to competitive exclusion, even though the lactic acid bacteria counting did not increase significantly in this habitat. Treatment with Bokashi administration had lower counting of enterobactérias in the crop, possibly due to the fact that Bokashi is a fermented product, with low pH, that could act readily in the crop. The administration of *B. subtilis* spores did not have any effect on the populations of the analyzed bacteria, in the crop and caeca of broiler chickens.

Keywords: broiler chicken, feed withdrawal, probiotic, enterobacteria, *Salmonella*.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o padrão de consumo mundial de alimentos está mudando em função de consumidores mais exigentes, que demonstram mais preocupação com a qualidade e a segurança dos alimentos ingeridos. Crises recentes de segurança e sanidade de alimentos, causadas por doenças de animais como a síndrome da “vaca louca”, a febre aftosa e a gripe do frango na Ásia, têm atraído a atenção dos consumidores.

Outra tendência que vem alterando a criação de animais para consumo humano é a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento, que foi adotada primeiramente pela Suécia, e logo depois pela Dinamarca (MELLOR, 2000). Atualmente toda a Europa se mostra inclinada a banir os antimicrobianos da criação de aves, pois a União Européia adotou proibições em 1999 banindo os antibióticos avoparcina, tilosina, bacitracina, virginiamicina e proibindo também o uso das substâncias monensina e salinomicina como promotores de crescimento (DEMATTÊ FILHO; MENDES, 2001).

Existe hoje uma preocupação com doenças entéricas em frangos, bem como a preocupação com o uso exacerbado de antibióticos durante o ciclo de criação. As doenças entéricas recebem bastante atenção na avicultura industrial devido à perda na produtividade, alta mortalidade e à contaminação dos produtos para o posterior consumo humano (PATTERSON; BURKHOLDER, 2003). A alta freqüência de bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos presentes em produtos de origem animal, bem como o aumento de sua resistência aos antimicrobianos utilizados como suplementos alimentares, levaram a questionar o uso indiscriminado de antibióticos como aditivos em rações animais (GIL DE LOS SANTOS; GIL-TURNES, 2005). A demanda é para uma produção mais natural obtida em condições de saúde e bem estar animal adequados.

Os frangos podem veicular diversos tipos de microrganismos patogênicos, mas nos anos recentes as informações mostram que *Salmonella* está entre as principais causas de doenças transmitidas por alimentos relacionadas com aves. No Brasil, o mercado de carne de frango está em constante expansão, assim como a preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos, com a legislação sendo sempre aprimorada, como por exemplo a Portaria nº11 de 29/11/2004, do Ministério da Agricultura, que dispõe sobre o programa de controle de resíduos em carne, leite e pescado (BRASIL, 2004). São produzidos no país frangos de corte nos sistemas convencional, frangos do tipo natural e caipira ou colonial.

Há fortes evidências de uma demanda por alimentos naturais e saudáveis por parte dos consumidores e um exemplo é a exigência por produtos animais isentos de resíduos químicos. A tendência é a de que os compradores busquem produtos de empresas capazes de demonstrar programas de saúde que não dependam de antibióticos.

Com os atuais níveis de tecnologia e produtividade que imperam na indústria de produção animal, é difícil imaginar a ausência de aditivos alimentares para a prevenção de doenças ou como promotores de crescimento, e por este motivo são pesquisadas e apresentadas, a todo o momento, diferentes alternativas a esta questão, das quais os probióticos se mostram as mais promissoras (GIL DE LOS SANTOS; GIL-TURNES, 2005).

No caso da carne de frango, uma medida de controle quanto à sanidade do alimento muito utilizada nas granjas e nos frigoríficos é o jejum alimentar, empregado com o objetivo da redução do risco de contaminação microbiológica das carcaças na linha de processamento. Sabe-se que um dos principais motivos da disseminação de salmonela em abatedouros de aves é o vazamento de conteúdo intestinal dos animais, especialmente durante as operações de evisceração, o que acaba contaminando outras carcaças. Este conteúdo intestinal também contamina o exterior do frango durante o transporte, já que as gaiolas são empilhadas em caminhões e as aves nos andares inferiores recebem material fecal das aves presentes nos andares superiores.

Os principais reservatórios de salmonela no trato gastrintestinal de frangos são o papo, o intestino e o ceco, os quais podem ser facilmente rompidos durante a evisceração. O tempo de jejum ideal faria com que a contaminação presente nestes órgãos diminuísse para evitar problemas posteriores com o alimento contaminado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Jejum alimentar

O jejum pré-abate é um processo onde a ave é privada de alimentação e água para que possa ocorrer o esvaziamento do trato digestivo dos animais (NORTHCUTT et al., 2003b), e é uma prática rotineira utilizada nas granjas e frigoríficos com o objetivo de evitar contaminação das carcaças durante o processamento de abate. A contaminação pelo conteúdo gastrintestinal das aves pode comprometer a qualidade das carcaças, reduzindo a vida útil do produto, além de representar um risco à saúde do consumidor. Quando ocorre a contaminação no processamento, as carcaças são lavadas ou então retiradas da linha de abate, dependendo do grau de contaminação. Essa medida eleva o custo e o tempo no processo de abate, além de evitar a contaminação de carcaças pelo conteúdo gastrintestinal. Com o jejum também é possível economizar com a alimentação que não será convertida em carne.

Em muitas empresas, ainda existe uma grande variação no período de jejum, recomendando-se que as operações de apanha, transporte e espera sejam coordenadas pela área de produção a fim de evitar jejuns prolongados (MENDES, 2001).

É necessário um jejum alimentar maior que 4h para esvaziar o trato gastrintestinal dos frangos. Períodos maiores de jejum têm sido citados (WARRIS et al., 1990), os quais poderiam ocasionar a uma redução no rendimento da carcaça (VEERKAMP, 1986; LYON et al., 1991; MENDES, 2001).

A contaminação de carcaças de aves com enteropatógenos humanos continua sendo um problema para a indústria de processamento de frangos, para as agências regulatórias em segurança dos alimentos, e também para os consumidores cada vez mais preocupados (CORRIER et al., 2001). Submeter as aves ao jejum reduz o risco de se espalhar material fecal entre as aves vivas durante o transporte, e entre as carcaças durante os tratamentos, facilitando o esvaziamento do trato gastrintestinal do animal antes que seja transportado ao abatedouro (HINTON et al., 2000a).

Durante o processo de abate, as aves são insensibilizadas com choque elétrico, para depois passarem pelo processo de sangria. Após a sangria, sofrem escaldagem com água quente (temperatura de 50 a 65º C) e então seguem para a depenagem. Esta etapa é realizada em salas separadas do restante da construção através de aberturas, e que são chamadas genericamente de

“área suja”. Após a depenagem, os frangos entram na “área limpa”, onde se dará o processamento propriamente dito. Nesta área acontece a evisceração dos frangos, onde existe o maior risco de contaminação das carcaças por extravasamento do conteúdo das vísceras do animal. Após a evisceração, as aves são imersas em tanques com água a 0ºC, onde ocorre seu resfriamento, e depois recebem o processamento adequado a cada tipo de produto a ser comercializado.

Uma das características indesejáveis do período de jejum pré-abate é a diminuição da capacidade natural do papo em inibir a colonização por *Salmonella* sp., bem como por outras enterobactérias, pois aparentemente a falta de alimento está relacionada à diminuição da população de bactérias ácido-lácticas, diminuição na concentração de ácido propiônico, acético e lático, e também aumento do pH do papo (HINTON et al., 2000b). Corrier et al. (2001) citam o jejum como fonte de aumento na contaminação por *Salmonella* e *Campylobacter* em papos de frangos. A utilização imprópria do jejum tem sido ligada à contaminação de frangos de corte com conteúdo intestinal durante as operações de processamento (HINTON et al., 2000a).

Segundo Denadai et al. (2002), o tempo de jejum deve ser calculado levando-se em consideração a situação do aparelho digestivo e também o estado de desidratação da ave, já que o jejum durante tempos prolongados melhora o esvaziamento do trato gastrintestinal, mas também aumenta a desidratação, implicando em menor rendimento da carcaça.

2.2 Conteúdo intestinal e contaminação no abatedouro

As aves com intestino vazio têm potencialmente menor probabilidade de causar contaminação das carcaças durante o processamento. Considera-se como material contaminante no abatedouro o alimento, fezes, bile, intestino, material de cama e sujidades aderidas às patas, penas e peles de aves. O frango de corte possui microbiota intestinal bastante diversificada. Além das fezes, esses microrganismos colonizam a cama, onde continuarão se multiplicando, dependendo das condições de umidade e temperatura. A partir daí, podem voltar a ser ingeridos pelas aves ou ficar aderidos às penas, peles e patas. A contaminação no abatedouro está diretamente relacionada com a presença de conteúdo intestinal, tanto dentro como fora da carcaça eviscerada, ocorrendo quando o trato digestivo se rompe ou é cortado, ou quando as fezes são expulsas (MENDES, 2001).

Quando ocorre contaminação durante o processo de abate, as carcaças são lavadas ou têm a parte afetada eliminada, podendo, em alguns casos, serem condenadas totalmente (BRASIL,

1998). Isso atrasa o processo de abate e aumenta o custo do processamento, além de colocar em risco a saúde do consumidor quando o controle de qualidade do abatedouro não é eficiente (DENADAI et al., 2002).

Como já foi evidenciado, o jejum antes do abate provoca o esvaziamento do aparelho digestivo. O procedimento é retirar primeiro o acesso à ração e, em seguida, à água. Ao retirar a água, é paralisada a passagem de alimento do papo, pró-ventrículo e moela para o intestino. Como regra geral, se a moela apresenta material de cama e pouco ou nada de alimento significa que o jejum foi excessivo (DENADAI et al., 2001).

Northcutt et al. (2003a) sugerem que a freqüência de contaminação das carcaças não depende apenas da quantidade e condição das fezes no trato gastrintestinal do frango durante o processamento, mas também da integridade do intestino e da eficiência dos empregados e dos equipamentos.

Denadai et al. (2001), comparando períodos de 0, 4 e 8 horas de retirada de ração e água, observaram que a quantidade de fezes no trato gastrintestinal diminui com o aumento do tempo de jejum, sendo menor com o tempo de 8 horas. Entretanto, essa diferença só foi significativa quando comparados os tratamentos de zero hora de jejum e oito horas, não havendo diferenças entre os tratamentos de zero e quatro horas, e entre quatro e oito horas.

2.3 Microbiota do papo e do ceco

O trato digestivo das aves é um tubo oco e fibromuscular, que vai da boca (bico) à cloaca, recoberto por um epitélio que, em algumas partes, está especializado para secreção, digestão e absorção (MACARI; FURLAN; NAKAGHI, 1994). Simplificadamente, o TGI compreende a cavidade oral e a faringe, seguidas pelo esôfago, com o papo, o estômago mecânico (moela) o pró-ventrículo (estômago verdadeiro), intestino delgado e grosso, além das glândulas anexas: o fígado e o pâncreas (McLELLAND, 1986).

O papo dos frangos é uma dilatação do esôfago, com o formato de uma bolsa (DUKE, 1996); o esôfago é um segmento relativamente longo, e o papo, ou divertículo, separa as suas porções superior e inferior. O papo é originário da distensão da parede ventral do esôfago, possuindo um revestimento que permite a sua distensão sem prejuízo da mucosa (MACARI; FURLAN; NAKAGHI, 1994). Segue-se a moela, estômago e os intestinos, delgado e grosso, assim como o ceco. No frango, os cecos são duplos, diferentemente dos mamíferos, e encontram-

se na junção dos intestinos delgado e grosso, pertencendo a este último (DUKE, 1996). A parede dos cecos é mais fina do que as demais partes do trato intestinal (McLELLAND, 1986).

A microbiota presente nesses dois habitats, o papo e o ceco, é diferente. Comparando a população bacteriana de diferentes partes do TGI de frangos de corte, apesar de encontrar algumas coincidências entre espécies bacterianas no papo, duodeno e íleo, Wielen et al. (2002) demonstram que cada parte do TGI tem sua comunidade bacteriana específica e pode ser considerada como um ecossistema separado. De acordo com Menten e Pedroso (2005) as diferenças entre microbiotas do trato gastrintestinal são devidas a alterações de pH, de secreção enzimática da região, da velocidade de trânsito do bolo alimentar e até na concentração de ácidos graxos voláteis.

As distinções na microbiota também podem ser observadas analisando os mesmos órgãos de diferentes animais, e este fenômeno pode acontecer em habitats de todo o trato gastrintestinal (TGI) das aves. O frango saudável possui uma microbiota estável, que pode mudar de acordo com vários fatores como a dieta, a idade, a administração de antibióticos, infecções com microrganismos patogênicos, temperaturas muito altas ou muito baixas e transporte (Lu et al., 2003; Lan; Sakamoto e Benno, 2004). Embora exista algum conhecimento sobre as populações bacterianas do TGI de frangos, já foi demonstrado que apenas 20 a 50% das espécies de microrganismos existentes foram cultivadas e identificadas (PATTERSON; BURKHOLDER, 2003).

Segundo Guan et al. (2003), a microbiota do papo tem uma composição simples, dominada por bactérias lácticas, especialmente lactobacilos. Os autores afirmam que, durante a vida do frango, algumas espécies, como *Lactobacillus acidophillus* e *Lactobacillus plantarum* são encontradas em certos períodos, enquanto outras espécies são encontradas consistentemente, como *L. reuteri* e *L. johnsonii*, sendo considerados habitantes permanentes.

Zacconi et al. (1999) citam, além da colonização principal por lactobacilos, também bactérias entéricas e cocos fecais entre a microbiota do papo. Já no ceco, os autores afirmam haver predomínio de cocos anaeróbios (*Enterococcus* e *Streptococcus*), bastonetes Gram-negativos (*Bacteroides*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Fusobacterium*) e bastonetes Gram-positivos como *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Bifidobacterium*.

Estudos demonstram que o ceco possui uma microbiota complexa, com uma diversidade bacteriana surpreendente, formada principalmente por microrganismos anaeróbios e Gram-

positivos, sendo que os microrganismos Gram-negativos são responsáveis por menos de 10% da população total (ZHU et al., 2002; LU et al., 2003).

Guo et al. (2004) afirmam que o ceco é uma das áreas com maior atividade bacteriana do trato gastrintestinal, pois o tempo de trânsito alimentar lento fornece um ambiente estável, resultando em uma grande população microbiana. As contagens bacterianas do ceco são próximas de 10^{11} células/grama (base seca), com a população de anaeróbios em torno de 10^{9} e 10^{10} células/g (ZHU et al., 2002; GUO et al., 2004).

2.4 Enterobactérias e *Salmonella*

A família das enterobactérias, ou seja, *Enterobacteriaceae*, inclui os microrganismos anaeróbios facultativos, bacilos Gram-negativos, que fermentam glicose a ácido, são oxidase-negativos, geralmente catalase-positivos, normalmente reduzem nitrato e são móveis por flagelos peritríquios ou imóveis. Os gêneros mais comuns da família *Enterobacteriaceae*, causadores de doenças transmitidas por alimentos, são *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. As enterobactérias foram utilizadas por anos na Europa como indicadores de qualidade dos alimentos e índices de segurança alimentar, havendo autores que ainda defendem seu uso ao invés da análise de coliformes para este fim, alegando que com a análise de enterobactérias pode-se fazer melhor análise de microrganismos glicose-positivos e lactose negativos presentes na microbiota (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Uma das mais importantes doenças transmitidas por alimentos é a salmonelose, transmitida por *Salmonella* sp., que é um gênero da família *Enterobacteriaceae*. Os representantes deste gênero possuem as mesmas características já descritas para as enterobactérias. As características fenotípicas do gênero, entretanto, são as seguintes: as salmonelas são móveis, com exceção de *S. pullorum* e *S. gallinarum*; a maioria das cepas, com exceção da *S. typhi*, são aeróbias, utilizam o citrato como única fonte de carbono, descarboxilam a lisina, a arginina e a ornitina; a reação de vermelho de metila é positiva, a prova de Voges-Proskauer é negativa e a prova de indol é negativa. A fenilalanina não é desaminada, a uréia não é hidrolisada, a gelatina não é liquefeita rapidamente nos meios nutritivos e não são produzidas DNAse ou lipase (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1996).

Segundo o Food and Drug Administration (1992) *Salmonella* sp. é uma enterobactéria Gram-negativa que pode causar febre, diarréia e dores abdominais de 12 a 72 horas após sua ingestão. O instituto americano indica os frangos como uma das principais fontes animais da bactéria, juntamente com suínos. Silva e Duarte (2002) citam *Salmonella enteritidis* como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil, emergindo a partir de 1993. Aproximadamente 2000 sorotipos podem causar doenças em humanos.

A salmonelose é uma infecção de importância em saúde pública, devido ao impacto que causa tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. É uma enfermidade aguda de distribuição mundial, sendo que a incidência de salmonelose de origem alimentar aumentou e alcançou proporções epidêmicas em vários países do mundo industrializado. Esse incremento nos casos da doença é o resultado de uma combinação de fatores relacionados com o desenvolvimento na industrialização em todas as fases do processamento dos alimentos, mudanças nas práticas de manejo, assim como no armazenamento, distribuição e preparação dos mesmos (GUTIÉRREZ-COGCO et al., 2000).

No Brasil, investigações recentes de surtos de toxinfecções alimentares ocorridos em diferentes regiões, e de ocorrências de salmonelas em diferentes alimentos, constatam que *S. enteritidis* é atualmente o principal sorovar causador de salmoneloses e o mais prevalente em produtos de frangos (BAÚ et al., 2001). *Salmonella enteritidis* é invasiva em frangos e, portanto, tem a capacidade de contaminar ovos por transmissão transovariana após colonização do trato gastrintestinal (RICKE, 2003).

Santos et al. (2003) colocam os produtos de frango como uma fonte freqüentemente indicada de doenças gastrintestinais humanas, principalmente quando estas são causadas por *S. enteritidis* e *S. typhimurium*. Entretanto, segundo os autores, esta relação continua obscura pela falta de identificação de sorovares, representando um ponto crítico para as investigações epidemiológicas, que têm como objetivos a prevenção das infecções, bem como a erradicação de suas fontes.

Ramirez et al. (1997) citam a colonização do ceco e do intestino das aves durante a fase de criação como a principal fonte de contaminação por *Salmonella* em abatedouros. O papo também é considerado uma fonte primária do microrganismo, pois os autores reportam maior incidência de ruptura de papos durante evisceração, bem como maior incidência de *Salmonella* nos papos quando comparados com cecos.

Segundo Zhu et al. (2002), vários estudos foram feitos para diminuir a incidência de contaminação por *Salmonella sp*. no trato intestinal de frangos de corte, através da exclusão competitiva administrando bactérias diversas a pintinhos; nestes estudos, há um consenso de que misturas complexas de cecos de adultos produzem melhor proteção contra infecção por *Salmonella* do que isolados de um único tipo de bactéria.

2.5 Aditivos presentes nas rações

Na produção avícola, o principal objetivo é a obtenção de alta produtividade, aliada à qualidade dos produtos finais. Para isso, utilizam-se aditivos alimentares, como os antibióticos, com a função de promover o crescimento dos frangos (LODDI et al., 2000). A busca pela máxima eficiência alimentar na avicultura é um ponto crítico a ser considerado nas criações comerciais, e por isso os aditivos são rotineiramente utilizados para controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo, promovendo a melhora nos índices zootécnicos e maximizando a produção (MACARI; FURLAN, 2005).

Os aditivos, em sua maioria não-nutritivos, são utilizados para assegurar que os nutrientes sejam ingeridos, digeridos, protegidos da destruição, absorvidos e transportados às células do organismo (LANCINI, 1994).

Até hoje o mecanismo de ação destas substâncias é motivo de controvérsia. De um modo geral os efeitos do seu uso podem ser agrupados em três categorias: metabólico, nutricional e controle de doenças. Desses, admite-se que o modo de ação primário é o de controlador de doenças, promovendo um desequilíbrio na microbiota gastrintestinal, desalojando as bactérias indesejáveis e favorecendo a colonização pelas desejáveis (SUNDE et al., 1990). Este mecanismo de ação encontra explicação no fato de que ocorre melhor resposta ao uso de antimicrobianos em animais jovens em relação aos mais velhos, em meio ambiente contaminado do que nos limpos e em animais com menor resistência a doenças que nos mais saudáveis (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1994).

Com o uso dos antibióticos como aditivos sendo recriminado em uma diversidade de países, surgiram alternativas para a produção avícola como, por exemplo, os probióticos e um produto comercial chamado Bokashi, uma mistura de farelos mais utilizada em agricultura, mas que também pode ser utilizada como fonte de EM (Effective Microorganism – Microrganismos Efetivos). O Bokashi fornece nutrientes para estes microrganismos poderem crescer. Dahal

(1999) relatou que o uso de Bokashi-EM preparado com farelo de arroz mais EM líquido na água diminuiu a mortalidade das aves, melhorou a digestibilidade da ração aumentando o ganho de peso das aves. Outra vantagem é que o Bokashi-EM tem menor custo de produção quando comparado com antibióticos e outras substâncias do gênero.

Segundo Loddi et al. (2000), um bom aditivo para substituição dos antibióticos deve manter os seus efeitos benéficos, como não causar perda de produtividade e de qualidade nos produtos finais, mas eliminar as características indesejáveis, como a resistência bacteriana.

2.5.1 Antibióticos

Antibióticos são definidos por Phillips et al. (2004) como "componentes de ocorrência natural, semi-sintética ou sintética com atividade antimicrobiana, que podem ser administrados de forma oral, parenteral ou tópica". Esses compostos são utilizados tanto em humanos como em animais, no tratamento e prevenção de doenças, além de poderem ser utilizados como promotores de crescimento em animais criados para o consumo humano. As funções de prevenção de doenças e promotores de crescimento são muito controversas entre pesquisadores, pois aplica-se o antibiótico sem que exista diagnóstico de um microrganismo a ser destruído, o que pode causar os efeitos deletérios atribuídos às drogas.

Phillips et al. (2004) também definem promotores de crescimento como "substâncias antimicrobianas administradas normalmente como aditivos alimentares durante um período de tempo, para animais em crescimento, que resultam em melhora no desempenho fisiológico".

Apesar dos benefícios envolvidos no uso de antibióticos como a melhora no crescimento das aves, na conversão alimentar e redução de doenças, existe a preocupação de que os consumidores estejam ingerindo concentrações prejudiciais de resíduos das drogas na carne dos frangos (DONOGHUE, 2003). Além disso, o uso de aditivos antimicrobianos pode resultar em desenvolvimento de resistência nos microrganismos (JIN et al., 1998). Segundo Turnidge (2004), o uso de aditivos antimicrobianos em animais, especialmente os animais produzidos para alimentação humana, é atualmente o assunto que mais gera debates na área dos antibióticos; todas as linhas do debate concordam com o fato de que a resistência microbiana a antibióticos foi gerada em animais criados para o consumo humano, pelo motivo óbvio de que são utilizadas drogas análogas às utilizadas terapeuticamente em humanos.

Em uma população de microrganismos, pode haver bactérias que não são inibidas pelas concentrações de antibióticos que inibem a maioria das células. Esses indivíduos são chamados mutantes. Se forem adicionadas concentrações inibitórias de antibióticos em uma população bacteriana que possui indivíduos mutantes resistentes, a multiplicação dos organismos sensíveis irá cessar, enquanto os mutantes continuarão a se desenvolver, tendo como resultado uma população exclusiva de células resistentes (LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995). Como a resistência aos aditivos pode ser transferida entre diferentes bactérias, através de plasmídeos, e entre os seus hospedeiros, através da colonização de cepas resistentes, existe a preocupação de que o uso de aditivos alimentares antimicrobianos possa contribuir para um aumento da quantidade de genes de resistência no ambiente (ANADÓN; MARTINEZ-LARRAÑAGA, 1999; COLLIGNON et al., 2005).

As bactérias resistentes a antibióticos carregadas por animais podem entrar na cadeia alimentar humana através do consumo da carne ou outros produtos de origem animal, de água residual de fazendas, ou por outros veículos. As carnes acabam contaminadas por bactérias resistentes a antibióticos freqüentemente durante o processo de abate, e a larga distribuição dessas bactérias pode causar muitos problemas à saúde dos seres humanos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003).

Tais problemas afetam a comercialização dos animais criados com a utilização de aditivos antimicrobianos, já que existem grupos de consumidores exigentes em relação ao assunto. Loddi et al. (2000) alertam para o fato de que esses consumidores apresentam restrição ao consumo de carnes de aves criadas com rações contendo antibióticos, em particular no mercado externo para o qual se destinam 12 a 14% da produção brasileira de frangos de corte.

2.5.2 Probióticos

A definição mais utilizada de probióticos é a de Fuller em 1989, apud Schrezenmeir e De Vrese (2001), que definiu probiótico como “um suplemento alimentar de microrganismos vivos que afeta beneficamente o hospedeiro animal pela melhora de seu balanço microbiológico intestinal”. Analisando esta e outras definições, Schrezenmeir e De Vrese (2001) chegaram a uma proposta mais abrangente, já que a exposta por Fuller limita o local de ação do microrganismo e o hospedeiro (um animal). A conclusão foi que probiótico “é uma preparação de, ou um produto, contendo microrganismos viáveis e definidos em número suficiente, que alteram a microbiota

(por implantação ou colonização) em uma parte do TGI do hospedeiro e, por esses meios, exercem efeitos benéficos na saúde do mesmo".

Os probióticos têm sido consumidos há séculos, principalmente sob a forma de alimentos fermentados. Em 1907, Metchnikoff publicou estudo em que postulava que a ingestão de bactérias ácido-lácticas tinha influência positiva na microbiota natural do trato intestinal (ROLFE, 2000). Segundo Patterson e Burkholder (2003) desde que foi feito esse postulado, numerosos estudos foram feitos, demonstrando que a microbiota comensal intestinal inibe patógenos, que distúrbios da microbiota intestinal podem aumentar suscetibilidade a infecções, e que a adição de probióticos aumenta a resistência a elas. Por este motivo, uma variedade de microrganismos vem sendo testada e utilizada como probióticos e, de acordo com Menten e Pedroso (2005), muitos de forma arbitrária, baseados em ensaios de desempenho que possuem resultados variáveis, sem que os pré-requisitos que condicionam sua eficácia sejam observados.

Para Loddi et al. (2000) a eficiência de um probiótico depende da cepa utilizada e da quantidade administrada. Entre os diversos gêneros de microrganismos utilizados, é possível citar *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactococcus* e *Saccharomyces.* Microrganismos de uma mesma espécie podem ter constituições muito diferentes, como por exemplo *Lactobacillus plantarum* e *L. jonhsonii*, que possuem genomas excepcionalmente diferentes para duas bactérias do mesmo gênero, e possuem características muito diferentes no que diz respeito a adaptação a diversos tipos de ambientes (BOEKHORST et al., 2004), afetando assim suas características probióticas.

Hong, Duc e Cutting (2005), classificam a utilização de probióticos em dois campos de ação: para uso em animais e em humanos. Ainda de acordo com os mesmos autores,os probióticos utilizados em animais são considerados alternativas a antibióticos e, portanto, utilizados como promotores de crescimento. Segundo Dale (1992) apud Pedroso (2003), a base para utilização de probióticos em animais é que os microrganismos presentes na microbiota intestinal natural não são suficientes para se alcançar um bom rendimento e, partindo-se deste princípio, a adição de bactérias benéficas pode fazer com que o animal se torne mais saudável, faça melhor digestão dos alimentos e resista à colonização de bactérias prejudiciais por exclusão competitiva.

De acordo com Schneitz (2005), a exclusão competitiva é o "fenômeno pelo qual a microbiota intestinal normal protege o hospedeiro contra patógenos invasivos". Ainda segundo a

autora, os resultados de diversos estudos sugerem que a proteção por exclusão competitiva é um fenômeno predominantemente físico, e essas características são mais importantes que a produção de ácidos graxos voláteis ou outros metabólitos aos quais são atribuídas funções protetoras. Menten e Pedroso (2005) atentam para o fato de que microrganismos com capacidade de adesão às vilosidades intestinais são promissores como probióticos, por se caracterizarem como componentes deste habitat e poderem, portanto, colonizar o local e realizar a exclusão competitiva.

Para Mulder, Havenaar e Huis In't Veld (1997) um balanceamento dos microrganismo do trato gastrintestinal pode contribuir para resistência a doenças infecciosas e ajudar em uma digestão eficiente, especialmente em situações de estresse como as encontradas na indústria moderna de produtos cárneos.

A maioria dos probióticos comercializados possui uma ou mais espécies de bactérias ácido-lácticas (BAL), principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Balevi et al. (2001) ainda citam *Streptococcus* como uma espécie muito utilizada em preparações probióticas. As BAL são microrganismos presentes na microbiota natural de diversos animais, geralmente considerados seguros e possuem atividade antagonista contra bactérias patogênicas (GARRIGA et al., 1998).

Segundo Ehrmann et al. (2002) e Jin et al. (2000), existem dois possíveis mecanismos para os benefícios das BAL como probióticos: a capacidade de produzir substâncias como ácido láctico e bacteriocinas, que ajudam a impedir o crescimento de outros microrganismos, também citada por De Vuyst e Vandamme (1994); e a capacidade de aderir à mucosa do TGI e formar uma barreira contra a colonização por patógenos. Os mesmos autores demonstraram inibição de crescimento de *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* e *Escherichia coli* por 4 cepas de *Lactobacillus*, a saber: *L. animalis* TMW 1972, *L. salivarius* TMW 1992, *L. agilis* TMW 1964, *L. salivarius* TMW 1970. Além disso, também demonstraram evidências de que a inibição não aconteceu pela produção de bacteriocinas e outros componentes, mas pela alta produção de ácidos pelas BAL.

Apesar de a maioria dos estudos utilizar BAL como probióticos, atenção vem sendo dada a microrganismos formadores de esporos, principalmente *Bacillus* sp.. As vantagens deste tipo de bactérias sobre as formas vegetativas são fundamentalmente comerciais, pela facilidade de preparação, resistência e menor custo para processos de produção, além de vida útil maior em amplos limites de temperaturas (BARBOSA et al., 2005).

Apesar de apresentar vantagens comerciais sobre as BAL, os benefícios produzidos pela ingestão de microrganismos do gênero *Bacillus* ainda não são totalmente claros. Não existem evidências de colonização, embora existam hipóteses de reação do microrganismo com tecido linfóide, e outras hipóteses de germinação no intestino delgado, além de atividade imunoestimulante já reportada (DUC et al., 2004; SPINOSA et al, 2000). Culturas de *Bacillus subtilis* estão entre as mais vendidas como probióticos para uso em humanos e animais, e um dos benefícios atribuídos é de estímulo da secreção de imunoglobina A (GREEN et al., 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Primeira fase

Foram utilizados 270 frangos de corte, machos, da linhagem Cobb, com idade entre 47 a 49 dias, coletados aleatoriamente, em triplicata, de uma granja que utiliza manejo de criação do sistema alternativo.

3.1.1 Processo na granja e abatedouro

Foram avaliadas um total de 270 aves, em 3 amostragens. Em cada coleta, 90 aves foram divididas em grupos de 15 para cada período de abate, correspondendo a 6 períodos de jejum que foram: 3, 6, 9, 12, 15 e 18 horas. Foi mantido o acesso de todas as aves à água até 3 horas antes do abate, em todos os tratamentos. Essas aves foram apanhadas manualmente e colocadas em engradados plásticos (oito aves por engradado). O tempo de transporte até o abatedouro foi de 30 min. Em seguida, as aves foram submetidas ao processo normal de abate convencional no abatedouro, sendo penduradas pelos pés e submetidas à insensibilização elétrica com 1000 Hz e 60 V. Após a insensibilização foi feita sangria manual, e as aves seguiram para o túnel de sangria. Imediatamente na saída do túnel, as aves foram retiradas da linha de produção para que se iniciasse o processo de coleta das amostras.

3.1.2 Análises

a) Amostragem para análise microbiológica

As aves foram coletadas após a passagem pelo túnel de sangria. Das 15 aves de cada tratamento, foram separados 3 grupos de 5 aves para a retirada asséptica do ceco e o papo, coletados em frasco estéril para análises microbiológicas, constituindo-se 3 unidades analíticas de 5 cecos e 5 papos, separadamente. Isto foi feito pelo baixo peso das amostras e para possibilitar também o aumento da amostragem. Foram feitas as seguintes análises: contagem de enterobactérias e presença de *Salmonella*. As análises foram feitas somente neste ponto para aferir se o tempo de jejum afetaria ou não a contaminação das aves, especialmente para *Salmonella*.

b) Procedimento para obtenção das peças de papo e ceco

Com auxílio de bisturi e pinça estéreis foram abertas as cavidades das aves coletadas. Tanto o papo quanto o ceco tiveram suas extremidades amarradas com fio estéril e foram retirados com auxílio de pinça e tesoura estéreis, acondicionados em embalagens também estéreis, e estas transportadas em gelo até o laboratório de Higiene e Lacticínios da ESALQ/USP para que se procedessem as análises.

As unidades analíticas foram pesadas assepticamente e processadas em aparelho homogeneizador tipo Stomacher (MED MC 1204, ITR) durante 1 minuto, em água salina peptonada tamponada estéril, na proporção de 1:10 por 30s, sendo esta a diluição 10^{-1}. A partir desta foram feitas as diluições decimais até a 10^{-6} para as contagens de enterobactérias.

Para a análise de *Salmonella*, 25 g do material (papo e ceco) foram homogeneizados separadamente em 225 mL de BPW, sendo esse o caldo de enriquecimento, e o resultado expresso em ausência/presença em 25 gramas.

A partir deste homogeneizado foi feito o enriquecimento do ceco e do papo, separadamente, e o resultado expresso em ausência/presença. Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: presença de *Salmonella* e contagem de enterobactérias.

c) Análises microbiológicas

- *Salmonella*

A metodologia seguiu a descrita em Downes e Ito (2001).

Inicialmente foi feito pré-enriquecimento das 25 gramas da amostra em caldo BPW (Buffered peptone Water - Água Peptonada Tamponada), formulado vide Anexo A, incubado a 35ºC durante 24h em estufa bacteriológica (002 CB, Fanem).

Após a incubação, alíquotas de 1 mL foram inoculadas nos tubos contendo os caldos Tetrationato (TT, Merck) e Selenito Cistina (SC, Merck). Os meios foram incubados a 35ºC/24h em estufa e 43ºC/24h em Banho Maria (TE-0541-E1, Tecnal) respectivamente, realizando-se o enriquecimento para promover o crescimento seletivo da população de *Salmonella*.

Após a incubação, a partir dos tubos de SC e TT, foi feito o isolamento das colônias típicas de *Salmonella* em ágar Bismuto Sulfito (BS, Merck), ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Merck) e ágar Entérico de Hektoen (HE, BD). O isolamento foi feito pela técnica de

esgotamento, estriando-se nas superfícies dos meios com alça microbiológica. As placas foram incubadas invertidas a 35ºC/24h em estufa.

Em ágar BS, as colônias típicas de *Salmonella* são marrons ou pretas, com ou sem brilho metálico. Em ágar XLD as colônias são transparentes, cor de rosa escuro, com ou sem centro preto. Já em ágar HE, as colônias são transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto.

As colônias típicas de *Salmonella* foram inoculadas por picada no fundo e estria na rampa em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI, Merck) e Lisina Ferro (LIA, Merck), e incubadas a 35ºC/24h em estufa. Os tubos de TSI e LIA que se mostraram com características suspeitas para *Salmonella* foram submetidos a testes bioquímicos e sorológico somático polivalente. No TSI os tubos suspeitos foram os com rampa vermelha e fundo amarelo ou negro, sem formação de gás; os tubos de LIA suspeitos eram azul na rampa e fundo negro ou azul, sem formação de gás.

Os testes bioquímicos aplicados foram realizados de acordo com metodologia descrita por Downes e Ito (2001):

- teste de urease: transferência do inóculo com alça microbiológica para tubo com caldo uréia de Christensen (Merck) e incubação a 35ºC/24 horas em estufa. A alteração do meio de cor pêssego para rosa escuro indicou viragem alcalina do meio e teste positivo para salmonela.

- teste de indol: transferência do inóculo para caldo triptona 1% e incubação a 35ºC por 24 horas em estufa. Foi adicionado reagente de Kovacs e agitado levemente. O desenvolvimento de um anel vermelho na superfície do meio indicou teste positivo, sendo suspeito para salmonela.

- teste de fermentação do dulcitol: transferência do inóculo para caldo vermelho de fenol (Merck) suplementado com 0,5% de dulcitol. Incubação a 35ºC/48h em estufa. A alteração da cor do meio de avermelhada para amarela indicou viragem ácida do indicador e teste positivo para salmonela.

- teste de malonato: do caldo triptona, antes de ser utilizado para teste de indol, foi transferida uma alçada para caldo malonato modificado (Merck) e incubado a 35ºC por 48h em estufa. Alteração da cor do meio de verde para azul indicou teste positivo e viragem alcalina do indicador.

- teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer: foi transferido o inóculo para caldo VM-VP (Merck) e incubado a 35ºC/48h em estufa. Para o teste de VP, foi transferido 1 mL da cultura para tubo de ensaio separado e adicionado α-naftol. Depois de agitado o tubo, foi adicionado KOH 40%, além de cristais de creatina para acelerar a reação. Foi observado o desenvolvimento

de uma cor rósea ou vermelha no meio de cultura, indicando teste positivo. O teste de VM foi realizado incubando-se o tubo com caldo VM-VP por 48h adicionais em estufa a 35ºC, e depois adicionada solução de vermelho de metila. Observou-se coloração vermelha, indicando teste positivo.

- teste de citrato: transferiu-se o inóculo para tubo de ágar citrato de Simmons (Merck) inclinado. Incubou-se por até 96 horas a 35ºC em estufa, e observou-se a alteração da cor do meio de azul para verde, indicando teste positivo.

- SIM: inoculou-se por picada, com agulha microbiológica, as culturas suspeitas em tubos com ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM, Merck), no centro do meio de cultura, até uma distância a 1 cm do fundo. Os tubos foram incubados a 35ºC/24-48h em estufa. As cepas móveis migram da região da picada para outras partes do meio, indicando teste de motilidade positivo.

_ teste sorológico somático polivalente: a partir da cultura em TSI, transferiu-se uma alçada para dois quadrados demarcados em lâmina de vidro. Adicionou-se uma gota de solução salina fisiológica estéril e emulsionou-se a cultura. Sobre um dos quadrados foi adicionado anti-soro somático polivalente anti-*Salmonella* e emulsionou-se. A aglutinação no quadrado com anti-soro indicou cepas suspeitas de serem *Salmonella*.

As cepas que obtiveram resultados suspeitos de *Salmonella* em todos os testes bioquímicos foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para confirmação.

- Enterobactérias

A partir do homogeneizado dos cecos e papos foram feitas as diluições decimais em água salina peptonada até a 10^{-6}. Um mililitro das diluições de 10^{-4} a 10^{-6} foram semeadas em duplicata, em profundidade com sobrecamada, em ágar VRB (VermelhoVioleta Bile Lactose, Merck). Após a solidificação, as placas foram incubadas a 35° C/48 h em estufa. Foram consideradas para contagem as placas contendo entre 20 e 200 colônias de coloração vermelho púrpura, rodeadas por um halo avermelhado, com o resultado expresso em UFC/g (DOWNES; ITO, 2001).

- Análise estatística

Foi realizada análise de variância (ANOVA) para o estudo do efeito do tempo de jejum alimentar nas populações de enterobactérias e *Salmonella* sp. dos cecos e papos analisados.

3.2 Segunda fase

As aves foram obtidas de um incubatório comercial após sexagem. Foram utilizados 1944 pintos de corte, machos, com um dia de idade, linhagem Cobb. Os pintinhos receberam aquecimento com lâmpadas até o 15º dia. Após esse período as aves receberam iluminação natural com 6 horas de escuro. Houve reposição dos mesmos somente até 3 dias.

Os pintinhos foram alojados em 36 boxes de 1,5 x 3,0 m, com uma densidade de 12 aves/m^2, em galpões do tipo convencional. A ração foi fornecida através de comedouro do tipo inicial, sendo 2 para cada box. Este equipamento foi substituído por comedouro tubular definitivo após uma semana de criação. Durante todas as fases de criação, o bebedouro utilizado foi do tipo pendular. Foram utilizados 12,5 kg de cama de frango por box; o material de cama foi maravalha.

As aves foram distribuídas em um delineamento em blocos casualizados (2 blocos, correspondentes aos lados esquerdo e direito do aviário) com cinco tratamentos: 1 - Controle negativo; 2 - Promotor de crescimento; 3 - Bokashi; 4 -Gallipró®; 5 – Protexin®; e seis repetições cada, sendo 54 aves por box, totalizando 300 aves por tratamento.

As aves alojadas no aviário experimental da Korin Agropecuária Ltda. foram tratadas por um funcionário que utilizou bota descartável específica para cada tratamento, e que seguiu uma seqüência diária no manejo dos diferentes boxes, evitando-se a contaminação pela transferência física de microorganismos. A seqüência de manejo foi: Controle-1; Promotor de crescimento-2; Bokashi-3; Probiótico contendo *Bacillus subtilis* (Gallipró®)-4; Probiótico contendo bactérias ácido lácticas (Protexin®)-5.

As rações foram produzidas na fábrica de ração da Korin Agropecuária Ltda. As aves tiveram uma dieta balanceada em função das exigências nas diferentes fases, sendo utilizados os mesmos nutrientes na composição das rações experimentais; não foram utilizados produtos de origem animal.

A alimentação das aves foi dividida em 4 fases: inicial (1-7 dias), crescimento (8-21 dias), engorda (22-35 dias) e final (36-42 dias de idade). As rações foram formuladas com a seguinte composição: Energia Metabolizável (EM) 2.952,55 Kcal/kg e Proteína Bruta (PB) 23,0017% na fase inicial; na fase de crescimento, a composição das rações foi de 3.049,89 Kcal/kg de EM e 20,9984% de PB; 3.170,10 Kcal/kg de EM e 17,9838% de PB; na fase de engorda 3.210,50 Kcal/kg de EM e na fase final 16,9879% de PB.

As rações foram formuladas para frangos de corte machos (Tabela 1), utilizando-se os seguintes ingredientes: milho moído, soja desativada, farelo de soja, DL-Metionina, L-Lisina, Enzivacc-MS e Núcleo FC (pré-inicial, inicial, crescimento e final) e nutrientes: proteína, fibra, extrato etéreo, material mineral, e.m. aves, metionina, metionina + cistina, lisina, sódio, cálcio, fósforo, ácido linoleico.

Tabela 1 - Níveis nutricionais para as rações experimentais

Ingrediente	**Inicial (1 - 7 dias)**	**Crescimento (8 - 21 dias)**	**Engorda (22 - 35 dias)**	**Final (36 - 42 dias)**
Milho moído (g)	580,400	621,500	694,700	716,800
Soja desativada (g)	25,000	68,000	100,000	115,000
Farelo de soja (g)	363,000	279,000	172,000	136,000
DL-Metionina (g)	0,800	0,500	0,900	0,500
L-Lisina (g)	0,300	0,500	0,900	1,200
Enzivacc-MS (g)	0,500	0,500	0,500	0,500
Núcleo FC (g)	30,000	30,000	30,000	30,000
Nutriente				
Proteína (%)	23,0017	20,9984	17,9838	16,9879
Proteína dig. (%)	18,3445	16,7418	14,1393	13,3767
Fibra (%)	3,6422	3,5284	3,2699	3,2071
Extrato etéreo (%)	3,0041	3,9580	4,7834	5,1386
Matéria mineral (%)	5,2239	4,9126	4,5099	4,5244
E.M. aves (kcal/kg)	2.952,55	3.049,8409	3.170,10	3.210,50
Metionina (%)	0,5799	0,5585	0,5032	0,3794
Met + Cys (%)	0,9657	0,9132	0,8111	0,6731
Lisina (%)	1,2900	1,1742	1,0689	0,9503
Sódio (mg/kg)	1.767,24	1.743,90	1.721,78	1.712,02
Cálcio (%)	0,8967	0,7857	0,8986	0,8782
Fósforo total (%)	0,6376	0,6205	0,5791	0,5445
Fósforo útil (%)	0,3948	0,3882	0,3585	0,3254
Ácido linoléico (%)	1,3495	1,8904	2,3721	2,5752

A descrição de como os aditivos foram incluídos nas rações experimentais de cada um dos tratamentos está mostrada na Tabela 2, e a tabela 3 apresenta o consumo de ração das aves experimentais. Na Tabela 4 encontram-se os microrganismos presentes nos probióticos utilizados, e o antibiótico utilizado no tratamento com promotor de crescimento.

Tabela 2 – Descrição dos tratamentos experimentais

Tratamento	Inicial*	Crescimento*	Engorda*	Final*
Promotor	0,005	0,006	0,007	0,007
Bokashi	1,00	1,00	1,00	1,00
B. subtilis	0,05	0,05	0,05	0,05
Bactérias ácido lácticas	0,005	0,005	0,005	0,005

*: níveis de inclusão (%) dos aditivos adicionados às rações experimentais.

Tabela 3 – Consumo de ração estimado nas fases de crescimento das aves experimentais

				Consumo ração(Kg)	
Fases	**Consumo (kg/ave)**	**Nº total aves**	**Nº aves/trat.**	**Total**	**Ração/trat.**
Inicial	0,2	1944	300	388,8	64,8
Crescimento	1,1	1944	300	2138,4	356,4
Engorda	2,3	1944	300	4471,2	745,2
Final	1,5	1944	300	2916	486
Total	5,1	1944	300	9720	1652,4

Tabela 4 – Antibiótico e microrganismos utilizados nos diferentes tratamentos

Tratamento	**Níveis de Garantia**	
Bokashi	Bactérias anaeróbias	$1,00 \times 10^6$ UFC/g
	Enterobactérias fermentadoras de lactose	$1,00 \times 10^6$ UFC/g
	Enterococcus ssp	$1,00 \times 10^6$ UFC/g
	Lactobacillus acidophilus	$1,00 \times 10^6$ UFC/g
Gallipró®	esporos de *Bacillus subtilis*	$> 1,6 \times 10^9$ UFC/g
Protexin®	*Lactobacillus plantarium*	$1,26 \times 10^8$ UFC/g
	Lactobacillus bulgaricus	$2,06 \times 10^8$ UFC/g
	Lactobacillus acidophilus	$2,06 \times 10^8$ UFC/g
	Lactobacillus rhamnosus	$2,06 \times 10^8$ UFC/g
	Bifidobacterium bifidum	$2,00 \times 10^8$ UFC/g
	Streptococcus thermophilus	$4,10 \times 10^8$ UFC/g
	Enterococcus faecium	$6,46 \times 10^8$ UFC/g
Promotor de crescimento	Bacitracina de zinco	-

3.2.1 Processo no galpão e abatedouro

Após o início do período de 6 horas de jejum, as aves foram mantidas no galpão somente com acesso a água até 3 horas antes do abate, para todos os tratamentos. Essas aves foram apanhadas manualmente e colocadas em engradados plásticos (sete aves por engradado). O tempo de transporte das aves até o abatedouro foi de 30 min. Em seguida, as aves foram submetidas ao processo normal de abate convencional no abatedouro, sendo penduradas pelos pés e submetidas à insensibilização elétrica com 1140 Hz e 60 V. Após a insensibilização foi feita a sangria manual, e as aves foram encaminhadas ao túnel de sangria. Imediatamente na saída do túnel, as carcaças foram retiradas da linha de produção para o início do processo de amostragem.

3.2.2 Análises

a) Amostragem para análise microbiológica

Foram avaliadas um total de 180 aves, coletadas após passagem pelo túnel de sangria. Cada tratamento teve 36 aves, e foram separados 6 lotes de 6 aves para a retirada asséptica do ceco e o papo, coletados em frasco estéril para análises microbiológicas, constituindo-se 6 unidades analíticas de 6 cecos e 6 papos. Isto foi feito pelo baixo peso das amostras e para possibilitar também o aumento da amostragem. Foram feitas as seguintes análises microbiológicas: contagem de enterobactérias, bactérias lácticas, esporos de *Bacillus subtilis* e presença de *Salmonella*.

b) Análises microbiológicas

- *Salmonella*

Para as análises de *Salmonella*, o procedimento utilizado foi descrito anteriormente no item 3.1.2. da descrição de metodologias para primeira fase.

- Enterobactérias

Para as análises de enterobactérias, o procedimento foi descrito anteriormente no item 3.1.2 da descrição de metodologias para primeira fase.

- Bactérias Ácido Lácticas

A partir do homogeneizado obtido no item b.1, foram feitas diluições decimais até a 10^{-6} em água salina peptonada. As diluições foram inoculadas em duplicata, em profundidade em ágar de Man, Rogosa, Sharp (MRS, Oxoid), e em seguida colocadas invertidas dentro de jarras de anaerobiose, com gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a 35°C/72h em estufa. Para a contagem foram consideradas as placas contendo entre 20 e 200 colônias. Os resultados foram expressos em UFC/g de papo ou ceco (DOWNES; ITO, 2001).

- *Bacillus subtilis*

A metodologia seguida foi fornecida pela Christian Hansen, empresa produtora do probiótico Gallipró.

As amostras de ceco e papo foram homogeneizadas em água peptonada tamponada, na proporção de 1:10, para preparação da diluição 10^{-1}. A partir disto, uma nova diluição foi feita para cada amostra e tratada termicamente a 80°C por 10 minutos em Banho Maria, e em seguida resfriada em banho com gelo, sendo esta a diluição 10^{-2}. Diluições seriais foram preparadas partindo-se da diluição 10^{-2}, em duplicata. Utilizando-se a diluição 10^{-4}, foi transferido 0,1 ml do inóculo para cada uma das 5 placas contendo meio de cultura TBA-Base (Tryptose Blood Agar, Merck) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. O inóculo foi espalhado sobre a superfície com uma alça de Drigalski, imediatamente após a inoculação. As placas preparadas foram incubadas a 37º C por 20 horas em estufa, e as colônias típicas (circulares ou rizóides, opacas e de coloração creme) de *Bacillus subtilis* foram contadas, sendo o resultado expresso em UFC/g de esporos capazes de germinação.

d) Análise estatística

A análise foi feita utilizando-se ANOVA, da mesma forma que para os resultados da primeira fase, a não ser para as contagens de *B. subtilis*, onde foi utilizada uma planilha já montada fornecida pela empresa Christian Hansen, onde os resultados eram colocados e recebia-se os valores de contagens e desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Primeira fase

4.1.2 Enterobactérias

Os resultados das contagens de enterobactérias obtidas nos papos de frangos de corte são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Contagens de enterobactérias (logUFC/g) nos papos de dos frangos nos diferentes períodos de jejum

Amostragem	**LogUFC/g**					
	18h	**15h**	**12h**	**9h**	**6h**	**3h**
1	4,17	4,17	3,30	5,06	4,39	3,87
1	5,90	5,98	5,90	4,54	6,11	5,75
1	5,07	5,85	5,45	6,46	5,79	5,17
2	4,00	5,99	4,00	5,43	5,20	4,54
2	5,24	6,52	6,15	6,02	6,06	5,75
2	5,13	5,80	5,13	4,95	5,24	6,38
3	6,14	5,50	4,82	5,43	2,39	3,69
3	5,60	6,29	5,81	5,16	5,84	5,55

As contagens de enterobactérias obtidas nos cecos dos frangos analisados estão expostas na Tabela 6.

Tabela 6 - Contagens de enterobactérias (logUFC/g) nos cecos de dos frangos nos diferentes períodos de jejum

Amostragem	**LogUFC/g**					
	18h	**15h**	**12h**	**9h**	**6h**	**3h**
1	5,09	3,27	4,90	4,97	4,97	3,87
1	5,17	6,58	6,50	6,02	7,32	5,75
1	6,94	6,62	6,37	5,39	6,24	5,17
2	4,65	5,39	4,00	6,53	5,17	4,54
2	5,90	6,53	6,76	5,3	6,84	5,75
2	7,14	5,81	6,19	5,74	6,82	6,38
3	4,69	4,30	4,47	4,65	5,69	3,69
3	6,32	6,63	6,87	6,29	6,61	5,55

Em cada um dos tempos de jejum pode ser observada a população de enterobactérias no papo e no ceco. Verifica-se que no tratamento com 3 h de jejum, os frangos apresentaram uma

diferença significativa na contagem de enterobactérias entre papo e ceco. Nos outros períodos de jejum a diferença entre as populações não foi significativa.

Era esperado que no período de 3 horas de jejum a população de enterobactérias no ceco fosse significativamente maior do que no papo, pois autores como Ricke (2003) e Hinton et al. (2000b) citam a diminuição da capacidade natural do papo em inibir o crescimento de enterobactérias conforme aumenta o tempo de privação alimentar. Aparentemente a falta de acesso ao alimento está relacionada à diminuição da população de bactérias ácido-lácticas, diminuição na concentração de ácido propiônico, acético e lático e também aumento do pH do papo, o que aumenta inclusive a colonização por *Salmonella* sp. (HINTON et al., 2000b).

Apesar de não haver diferenças significativas entre as contagens de enterobactérias nos cecos e papos dos tratamentos de 6 horas ou mais de jejum, observa-se pela Figura 1 e pela tabela 7 um padrão no qual as populações de enterobactérias nos cecos foram sempre maiores do que nos papos.

Tabela 7 - Médias das contagens totais de enterobactérias em papo e ceco para diferentes tempos de jejum

Tratamento	**Contagem total de enterobactérias (logUFC/g)**	
	Ceco	**Papo**
3h	$6,32 \pm 0,94^{a}$	$5,18 \pm 0,94^{b}$
6h	$6,23 \pm 0,79^{a}$	$5,20 \pm 1,27^{a,b}$
9h	$5,57 \pm 0,61^{a}$	$5,43 \pm 0,68^{a,b}$
12h	$5,75 \pm 1,05^{a}$	$5,08 \pm 0,92^{a,b}$
15h	$5,83 \pm 1,31^{a}$	$5,63 \pm 0,77^{a,b}$
18h	$5,87 \pm 1,01^{a}$	$5,02 \pm 0,80^{a,b}$

^{a,b}: tratamentos com letras iguais não diferem significativamente entre si.

Realmente, a microbiota dos papos é diferente daquela dos cecos, se na primeira há predominância de bactérias ácido-lácticas, conforme já citado por Guan et al. (2003) e Zacconni et al. (1999), o ceco, por sua vez, possui uma microbiota mais complexa, onde predominam os microrganismos anaeróbios Gram-positivos como *Enterococcus* e *Streptococcus* (ZHU et al., 2002).

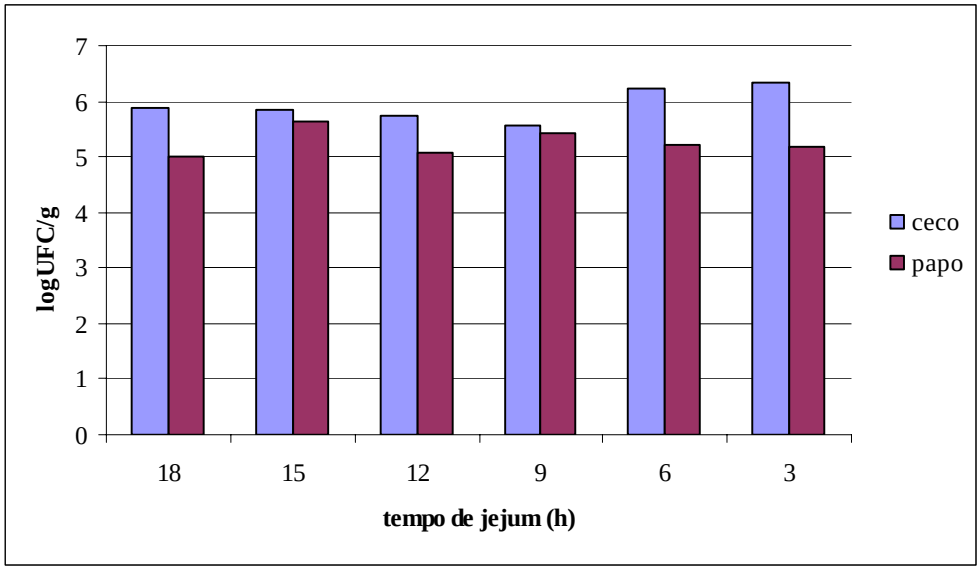

Figura 1- Comparação entre enterobactérias em cecos e papos de frangos de corte submetidos a diferentes tipos de jejum

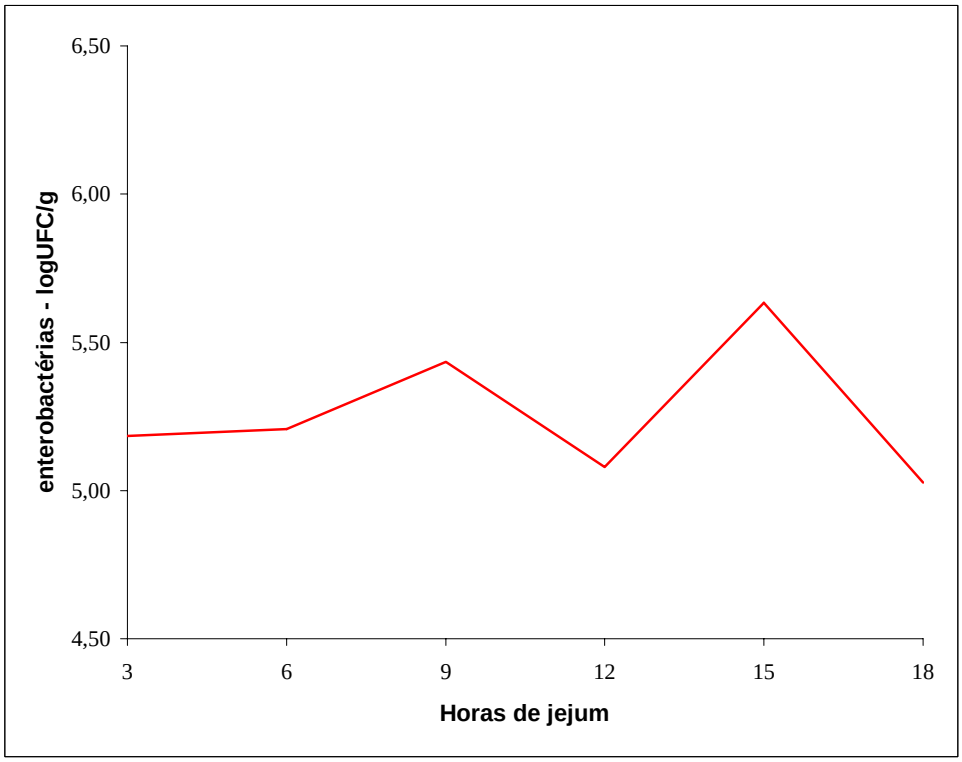

Figura 2 - Médias para contagem de enterobactérias em papo de frangos de corte submetidos a diferentes tempos de jejum

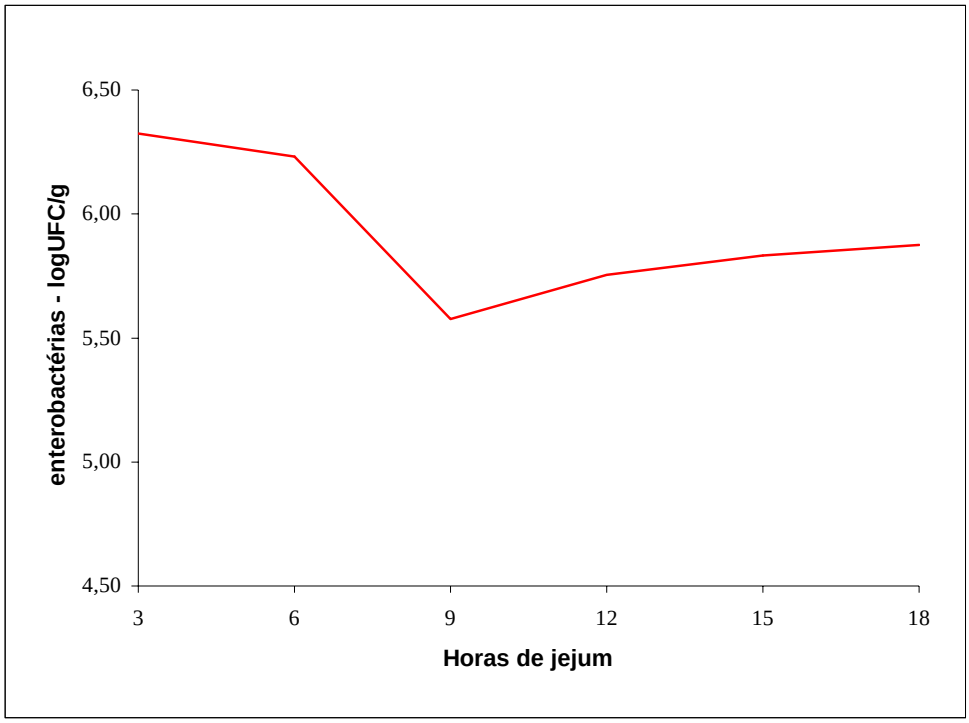

Figura 3 - Médias para contagem de enterobactérias em ceco de frangos de corte submetidos diferentes tempos de jejum

As figuras 2 e 3 revelam como ocorreu a variação das médias das contagens de acordo com os diferentes períodos de jejum.

Analisando-se os dados obtidos na Tabela 7, em conjunto com as análises estatísticas das Tabelas 5 e 6, pode-se afirmar que não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as contagens de enterobactérias nos papos e cecos analisados, nos diferentes períodos de jejum alimentar. Entretanto, a Figura 3 demonstra que após 9 horas de jejum existe uma redução na contagem de enterobactérias nos cecos, apesar de não ser significativa estatisticamente.

Nos papos, onde a população de enterobactérias foi menor, pode ser observado na Figura 2 que ela se manteve entre 5 e 5,5 logUFC/g, se alterando dentro desta amplitude conforme o tempo de jejum aumenta.

Nota-se certa diferença nas contagens entre ceco e papo e também, observando-se as Figuras 2 e 3, pode-se apontar que nos períodos de 3 e 6 horas de jejum, nos cecos, as contagens microbiológicas foram maiores do que no restante do período de privação alimentar. Em compensação, essas diferenças foram pequenas e os resultados mostram que os períodos de jejum

utilizados não afetaram significativamente a contagem de enterobactérias no papo e no ceco dos frangos de corte analisados.

Hinton et al. (2000a) também não encontraram diferenças significativas entre as contagens de enterobactérias nos períodos de jejum de 0 a 12 horas e de 12 a 24 horas, apesar de terem encontrado populações mais elevadas, da ordem de 7 log_{10}UFC/g, quando comparados com os encontrados no presente trabalho, que foram da ordem de 5 a 6 log_{10}UFC/g. Também neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que o conteúdo de matéria orgânica presente no ceco não diminui durante esses períodos de jejum, pois não foi encontrada diferença significativa entre os pesos dos cecos. Duke (1996) observou que um marcador não-absorvível administrado na alimentação das aves podia ser detectado nas fezes 2,5 horas após sua ingestão, sendo que maior parte era recuperada nas 24 horas seguintes; entretanto, nas excretas cecais marcadas podia ser detectado por mais 2 ou 3 dias após a ingestão dessa substância. Desse modo, períodos curtos de jejum como os empregados no presente trabalho, assim como em outros, dificilmente podem ser eficazes.

Northcutt et al. (2003a) fizeram experimentos com recuperação bacteriana nas carcaças de frangos, com diferentes tempos de jejum, e não encontraram diferenças significativas nas populações de coliformes, *Campylobacter* ou *Escherichia coli* encontradas, embora as contagens dessas bactérias encontradas nas carcaças fossem da ordem de 3 log_{10}UFC/g, bem menores que as verificadas no presente experimento para ceco e papo. A contaminação das carcaças no experimento de Northcutt et al. (2003a) pode ser proveniente dos cecos ou papos, que possuem população bacteriana maior, e que diminui ao ser distribuída após ruptura, demonstrando que a contaminação do interior das vísceras dos animais pode se espalhar pelo abatedouro e chegar às carcaças comercializadas. Se houver ruptura durante a evisceração, a microbiota presente no ceco e no papo se fixa nas carcaças de animais, nos equipamentos ou utensílios do abatedouro, ocasionando a contaminação de toda a produção seguinte.

Aplicando período de jejum de 12 horas e aumentando a quantidade de glicose na água de alimentação de frangos de corte, Hinton et al. (2000b) conseguiram diminuir significativamente a contagem de enterobactérias no ceco de frangos de corte, chegando à conclusão de que a glicose utilizada ajuda a manter a habilidade natural de inibir o crescimento de enterobactérias durante o jejum, pois estimula o desenvolvimento de bactérias fermentadoras, principalmente as bactérias ácido-lácticas, que consequentemente diminuem o pH pela produção do ácido láctico, podendo se

tornar uma alternativa para que se reduza a contaminação das vísceras, e conseqüentemente a contaminação no abatedouro devida às rupturas durante a evisceração.

No presente estudo, o jejum alimentar não alterou significativamente a contagem de enterobactérias presentes no ceco e no papo e esta condição pode ser devida ao pouco esvaziamento de ambos após a aplicação do jejum, conforme demonstrado por Hinton et al. (2000a) e Duke (1996). Se não houver o esvaziamento do trato gastrintestinal, a microbiota permanece no interior das vísceras, e é possível afirmar que ceco e papo continuarão sendo uma fonte primária de contaminação durante o abate das aves, principalmente no momento de sua evisceração. Portanto, no presente estudo, o jejum foi uma estratégia de pouca valia para redução da contaminação durante o abate dos frangos.

4.1.3 *Salmonella*

As análises de *Salmonella* foram realizadas seguindo-se a seguinte codificação:
A, B, C, D, E e F foram as letras utilizadas para os tratamentos de 3, 6, 9, 12, 15, 18 horas, respectivamente. As letras C e P foram utilizados para as peças de ceco e papo, respectivamente. E finalmente, os números 1, 2 e 3 foram utilizados para definir as diferentes amostras analisadas. Após as análises em TSI e LIA, os tubos com reações suspeitas para *Salmonella* foram submetidos a testes bioquímicos.

Para cepas típicas de *Salmonella*, os resultados esperados são: negativo para Uréia; negativo para Indol; negativo para Dulcitol; positivo para VM; negativo para VP; negativo para Malonato e positivo para Citrato e SIM. Partindo-se deste princípio, pode-se afirmar que houveram duas análises consideradas suspeitas, da segunda amostragem realizada, e conclui-se que as suspeitas são de *Salmonella* presente em ceco e papo, do tratamento de 15 horas de jejum.

As culturas suspeitas foram submetidas a teste de sorologia, obtendo-se aglutinação em ambas e, portanto, teste positivo de confirmação. Os isolados suspeitos, contudo, não foram confirmados como *Salmonella* pelo Instituto Adolfo Lutz, de modo que esse microrganismo não foi detectado nos frangos estudados.

Considerando-se como positivas as duas cepas submetidas à sorologia, obtém-se o resultado exposto na Tabela 8.

Não foram encontradas cepas de *Salmonella* sp. nos cecos e papos dos frangos analisados.

Ramirez et al. (1997) obtiveram resultados variáveis, porém bem mais altos dos encontrados aqui, da ordem de 60% de cecos contaminados, e chegaram à conclusão de que o tempo de jejum afeta a incidência de *Salmonella* de maneira crescente, conforme este tempo aumenta.

Tabela 8 - Efeito do tempo de jejum alimentar na colonização por *Salmonella* em ceco e papo de frangos de corte

Tempo de jejum	Cecos positivos	Papos positivos
3h	0/54	0/54
6h	0/54	0/54
9h	0/54	0/54
12h	0/54	0/54
15h	0/54	0/54
18h	0/54	0/54

Corrier et al. (2001) concluíram que a contaminação por salmonela no papo de frangos de corte aumenta significativamente durante o período de jejum de 8 horas, e sugerem que a contaminação do trato intestinal de frangos tem relação cíclica com a contaminação da cama, pois as aves tendem a ingerir a cama após a remoção do alimento e, portanto, se existir *Salmonella*, esta será transferida para o trato gastrintestinal do frango e vice-versa. Partindo-se deste princípio, é possível afirmar que, para os frangos analisados no presente trabalho, além da ausência de *Salmonella* nos cecos e papos, provavelmente também a cama onde foram criados deveria conter uma reduzida contaminação pelo microrganismo, já que este não foi detectado em nenhum dos lotes amostrados. De fato, no abatedouro pesquisado não era prática reutilizar a cama entre as criações, o que contribui para evitar a contaminação por *Salmonella* para o novo lote de aves que chegam ao galpão e, desse modo, ao final do ciclo de produção das aves. Quando a cama é reutilizada, a contaminação por salmonela do lote de frangos anterior permanece no galpão e recontamina o novo lote de frango, o que propicia uma maior taxa de contaminação (CORRIER et al., 2001). Partindo-se do princípio que o sistema de criação utilizado no presente trabalho foi o alternativo, sem o uso de antibióticos, a prevenção da contaminação por microrganismos como *Salmonella* deve feita de outras formas, incluindo o não-reaproveitamento da cama, o que neste trabalho se mostrou como uma provável explicação para que não se

encontrasse *Salmonella* sp. nas carcaças analisadas sendo, portanto, uma boa arma de combate para esse patógeno.

Northcutt et al. (2003b), analisando carcaças de frangos de corte submetidos a 12 horas de jejum, não encontraram alterações significativas tanto na incidência em carcaças, quanto na população de *Salmonella* presente nas aves que ingressavam no abatedouro até o final da etapa de evisceração. A diferença encontrada foi antes e depois da imersão das carcaças no tanque de *chiller*, sendo que as carcaças analisadas depois da imersão apresentaram contaminação menor. Portanto, a contaminação por salmonela pode ser diminuída pela lavagem das carcaças durante o resfriamento dos frangos. Quanto a não haver alterações na quantidade de microrganismos presentes na carcaça nas etapas iniciais do abate, os autores propuseram que se deva à pouca diferença de rompimento de papo e ceco durante a evisceração.

Produtos de frango (peito, coxa, sobrecoxa, asa, coração, moela, coxinha da asa) analisados na região Sul do país por Baú et al. (2001) tiveram uma taxa de contaminação por *Salmonella* de 10%, maior que a encontrada no presente trabalho para ceco e papo. A baixa contaminação em ceco e papo pode se espalhar para outras carcaças se o seu conteúdo for extravasado durante a evisceração, e assim a contaminação dos produtos e carcaças por salmonela pode ser maior que a encontrada nas vísceras, segundo os autores.

4.2 Segunda fase

4.2.1 Enterobactérias

As contagens de enterobactérias obtidas nos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Contagens de enterobactérias (logUFC/g) presentes em cecos e papos de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos na ração

Tratamento	Ceco (logUFC/g)	Papo (logUFC/g)
Promotor de crescimento	6,47 ± 6,45 [a]	5,07 ± 4,89 [A,B]
Bokashi	6,80 ± 6,76 [a]	4,98 ± 4,82 [A]
esporos de *Bacillus subtilis*	6,19 ± 6,22 [b,c]	5,39 ± 5,27 [A,B]
Bactérias Ácido Lácticas	6,29 ± 6,32 [a,b]	5,43 ± 5,34 [B]
Controle	6,30 ± 6,46 [c]	5,33 ± 5,14 [A,B]

[a,b,c]: Tratamentos com as mesmas letras são iguais entre si.

Na Tabela 9 observa-se que as contagens de enterobactérias obtidas dos cecos. Os resultados estatísticos demonstram que os tratamentos com promotor de crescimento, bactérias lácticas e Bokashi diferiram significativamente do controle na sua população de enterobactérias, enquanto não houve diferença entre o tratamento com *Bacillus subtilis* e o grupo de controle, apesar de ser o tratamento com menor contagem bacteriana. O teste F demonstrou um valor muito próximo ao F crítico para o tratamento com *Bacillus subtilis*, mas ainda assim menor e, portanto, não significativo.

Entre os tratamentos que diferiram do controle, o único a apresentar contagem de enterobactérias menor foi o que utilizou bactérias lácticas na alimentação, sendo que todos os outros tratamentos tiveram contagens maiores que o controle. Este resultado pode ser um indício da exclusão competitiva pelas bactérias lácticas, inibindo as enterobactérias presentes no ceco. Por outro lado, há a possibilidade inversa nos tratamentos com antibióticos e Bokashi, pois esses podem ter estimulado proliferação das enterobactérias, pois tiveram maiores contagens dessas populações.

Apesar da evidência de que as bactérias ácido lácticas inibiram o crescimento de enterobactérias, o mecanismo pelo qual estes microrganismos atuam como probióticos e afetam o organismo hospedeiro ainda não é bem definido (BOEKHORST et al., 2004). Garriga et al. (1998), demonstraram que cepas de *Lactobacillus salivarius* conseguiram colonizar o ceco e o papo de frangos de corte, e superar a microbiota indígena desses dois habitats. Da mesma forma, os resultados do presente trabalho poderiam indicar exclusão competitiva, mas, como será visto posteriormente, a população de bactérias lácticas não diferiu significativamente entre os tratamentos e, portanto, não aumentou a ponto de conseguir superar a microbiota natural do habitat em que se encontrava. Entretanto, deve-se observar que não foi feito um estudo qualitativo, e não se sabe se uma determinada cepa das bactérias ácido lácticas utilizadas obteve crescimento melhor que outras, não afetando a quantidade total de BAL.

Em frangos, Jin et al. (1998) encontraram populações de coliformes em cecos significativamente menores em grupos de aves tratadas com lactobacilos em concentrações de 0,05, 0,1 e 0,15% na ração, em relação ao grupo controle, e estes foram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Mulder, Havenaar e Huis in’t Veld (1997), em trabalho com lactobacilos na alimentação de frangos de corte através da ração e da água, chegaram à conclusão de que houve uma grande

variação nos resultados obtidos, e que os probióticos não tiveram nenhuma influência no nível de contaminação dos conteúdos cecais, não podendo, portanto, ser utilizados como estratégia de intervenção contra *Salmonella* sp., já que as enterobactérias são utilizadas como indicadores dos efeitos sobre *Salmonella*. Este resultado difere do presente trabalho, já que neste a quantidade de enterobactérias foi significativamente menor no tratamento no qual foram utilizadas bactérias ácido lácticas na dieta.

Como confirmação de um resultado já obtido na primeira fase do presente trabalho, as contagens de enterobactérias também foram maiores nos cecos que nos papos dos diferentes tratamentos observados.

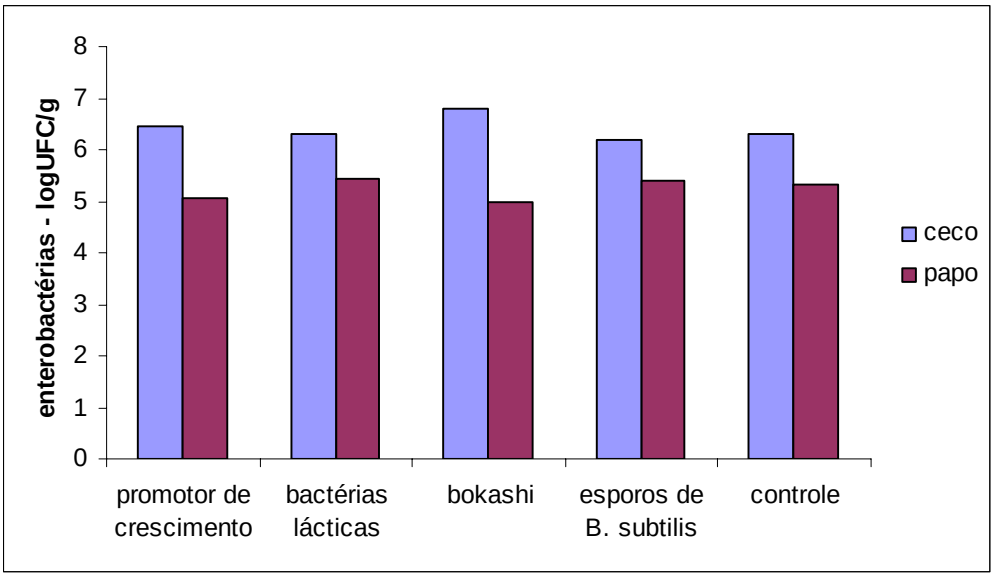

Figura 4 - Contagens de enterobactérias em cecos e papos de frangos de corte submetidos a dietas com promotor de crescimento e diferentes probióticos

Nos papos, nenhum tratamento diferiu do controle em relação à população de enterobactérias. A menor contagem dessas bactérias foi obtida no tratamento ao qual foi administrado Bokashi, enquanto a maior contagem de enterobactérias no papo foi observada no tratamento com bactérias ácido-lácticas, sendo esses dois (Bokashi e BAL) os únicos tratamentos que diferiram significativamente entre si. Portanto, observa-se que as bactérias lácticas diminuíram a população de enterobactérias nos cecos, mas não nos papos dos frangos de corte analisados, sendo que o Bokashi obteve o efeito contrário e diminuiu a contagem de enterobactérias nos papos, mas não nos cecos. Uma possível explicação para isto é o fato de que

o Bokashi é um produto fermentado e, portanto, possui ácidos orgânicos que agiriam prontamente no papo, que já possui um ambiente com pH menor, pela presença dominante de bactérias ácido-lácticas. Isso diminuiria as contagens de enterobactérias neste habitat. Mas, como o papo é um local de trânsito intenso do trato gastrintestinal, não se fixariam as bactérias ácido lácticas administradas na ração, e estas agiriam, então, no ceco, um local no qual permanecem por mais tempo, podendo assim colonizá-lo e diminuir a população de enterobactérias.

4.2.2 *Salmonella*

Não houve isolamentos de *Salmonella* sp. nos cecos e papos dos frangos analisados.

Como não houve desafio no presente estudo, e os frangos foram criados em galpão experimental previamente limpo, este resultado já era esperado, e repetiu o verificado na 1ª fase, já que a contaminação por *Salmonella* se dá no campo, ou pela reutilização de cama, que também não aconteceu no presente trabalho.

Uma forma de avaliar como os diferentes tratamentos afetariam a quantidade de *Salmonella* presente nos frangos é analisar as contagens de enterobactérias, já que *Salmonella* sp, é um microrganismo da família *Enterobacteriaceae*, e, portanto esta família pode ser utilizada como indicadora do comportamento de *Salmonella* (MULDER; HAVENAAR; HUIS IN'T VELD, 1997).

4.2.3 Bactérias Ácido Lácticas

As contagens de bactérias lácticas obtidas para os diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Contagens de bactérias ácido lácticas (logUFC/g) presentes em cecos e papos de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos na ração

Tratamento	Ceco (logUFC/g)	Papo (logUFC/g)
Promotor de crescimento	7,17 ± 6,55	6,41 ± 6,55
Bokashi	7,04 ± 6,51	6,33 ± 6,48
Esporos de *Bacillus subtilis*	6,91 ± 6,16	6,62 ± 6,55
Bactérias Ácido Lácticas	6,95 ± 6,93	6,63 ± 6,61
Controle	7,01 ± 6,69	6,64 ± 6,86

Os resultados estatísticos demonstram que não houve diferença significativa entre as populações de bactérias lácticas presentes tanto nos cecos quanto nos papos dos frangos analisados. Jin et al. (1998) administraram diferentes quantidades de lactobacilos na ração de frangos, utilizando um grupo de controle, e não obtiveram diferenças significativas entre as populações de lactobacilos encontradas nos cecos das aves, sendo que não foi encontrada uma explicação para o fato. No presente trabalho a população de lactobacilos também não foi diferente entre o grupo ao qual foram fornecidas bactérias lácticas na ração e o grupo de controle.

Considerando que o número de bactérias lácticas não diferiu do controle, mas que o tratamento com bactérias lácticas diminuiu a quantidade de enterobactérias em relação ao mesmo grupo, é possível afirmar que existe então algum outro mecanismo pelo qual as bactérias ácido lácticas inibiram este crescimento. Uma possibilidade é que neste estudo as análises foram quantitativas, não se identificando as diferentes espécies que colonizavam. O efeito biológico das BAL deve-se muito aos metabólitos produzidos, assim como bacteriocinas que possuem muitas vezes antagonismos específicos sobre certas bactérias. Isso pode ser mais determinante que o número de BALs que estão presentes no intestino (DE VUYST; VANDAMME, 1994).

Balevi et al. (2001) não encontraram diferenças significativas na melhoria de respostas imunológicas para vacina contra doença de Newcastle administradas via água em frangos criados com probiótico de BALs suplementadas na dieta, a qual continha as mesmas espécies de bactérias lácticas presentes no trabalho aqui desenvolvido (Tabela 4), o que pode ser devido a vários fatores, segundo os próprios autores. Um dos fatores citados era a idade, que foi de 40 dias no trabalho dos autores citados, enquanto no presente trabalho foi de 42 dias, outro foi a falha na escolha das cepas probióticas, por falta de especificidade para o hospedeiro e por não produzirem o efeito desejado, que são fatores que podem ter influenciado também os resultados aqui presentes. Outro fator que pode influenciar o resultado é a linhagem dos frangos, pois Balevi et al. (2001) utilizaram frangos da linhagem Hisex Brown, e no presente trabalho foram utilizados frangos Cobb. De qualquer forma, tanto o trabalho de Balevi et al. (2001) quanto o presente trabalho demonstram que cepas consideradas probióticas podem apresentar resultados divergentes, nem sempre eficientes ou bem compreendidos.

Também é possível observar que a população de bactérias ácido lácticas foi maior nos cecos que nos papos, apesar de estudos de Guan et al (2003) e Zacconi et al (1999), que citam que esses microrganismos fazem parte da microbiota dominante dos papos, e não dos cecos. De

qualquer forma, o ceco é um habitat com população bacteriana maior que a do papo, portanto o número de bactérias ácido lácticas pode ser maior no ceco que no papo, mesmo que estes não sejam os microrganismos dominantes no local, conforme demonstrado pelos resultados obtidos no presente trabalho. Uma outra possibilidade é a de que os cecos demoram mais para esvaziar que os papos, conforme já citados anteriormente os autores Duke (1996) e Hinton et al. (2000 a) e, portanto as bactérias ácido-lácticas permanecem por mais tempo nos cecos que nos papos.

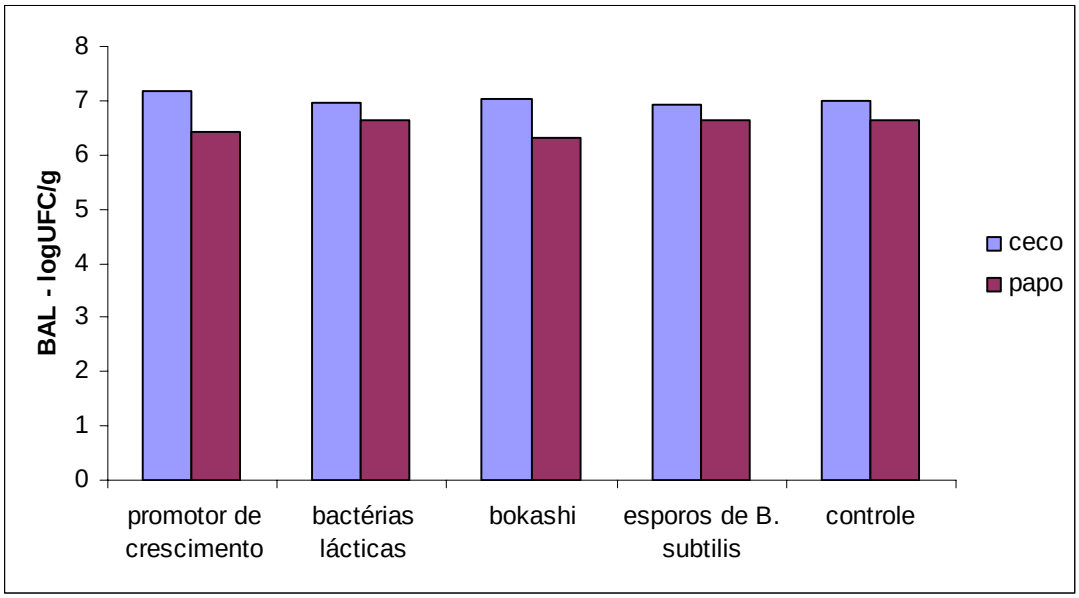

Figura 5 - Comparação entre contagens de bactérias ácido lácticas em cecos e papos de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos na ração

Pode ser observado na Figura 5 que nos tratamentos aos quais foram administrados bactérias lácticas e esporos de *Bacillus subtilis* houve menor diferença entre as populações de BAL nos cecos e nos papos, o que pode ser uma evidência de que, utilizando estes microrganismos como probióticos, existe uma melhor distribuição das bactérias lácticas por todo o trato gastrintestinal da ave.

4.2.4 Esporos de *Bacillus subtilis*

Os resultados encontrados para as contagens de *Bacillus subtilis* encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Contagens de esporos de *B. subtilis* obtidas em papos e cecos de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos na ração

Tratamento	Ceco (logUFC/g)	Papo (logUFC/g)
Promotor de crescimento	4,5 ± 4,41	4,99 ± 5,21
Bokashi	4,01 ± 3,89	4,30 ± 4,02
Esporos de *Bacillus subtilis*	5,20 ± 5,27	4,33 ± 4,06
Bactérias Ácido Lácticas	5,08 ± 5,15	4,79 ± 4,65
Controle	3,92 ± 3,57	3,96 ± 3,57

Conforme se observa na Tabela 11, não houve diferença estatística entre as contagens de esporos de *Bacillus subtilis* presentes nos cecos e papos dos diferentes tratamentos. Entretanto, as maiores contagens deste microrganismo ocorreram nos tratamentos com administração de esporos de *B. subtilis* e bactérias ácido lácticas na ração das aves. A comparação dos dados das Tabelas 10 e 11 mostra que as populações de BALs e enterobactérias encontradas nos cecos e nos papos foram maiores que as de esporos de *B. subtilis* em todos os tratamentos.

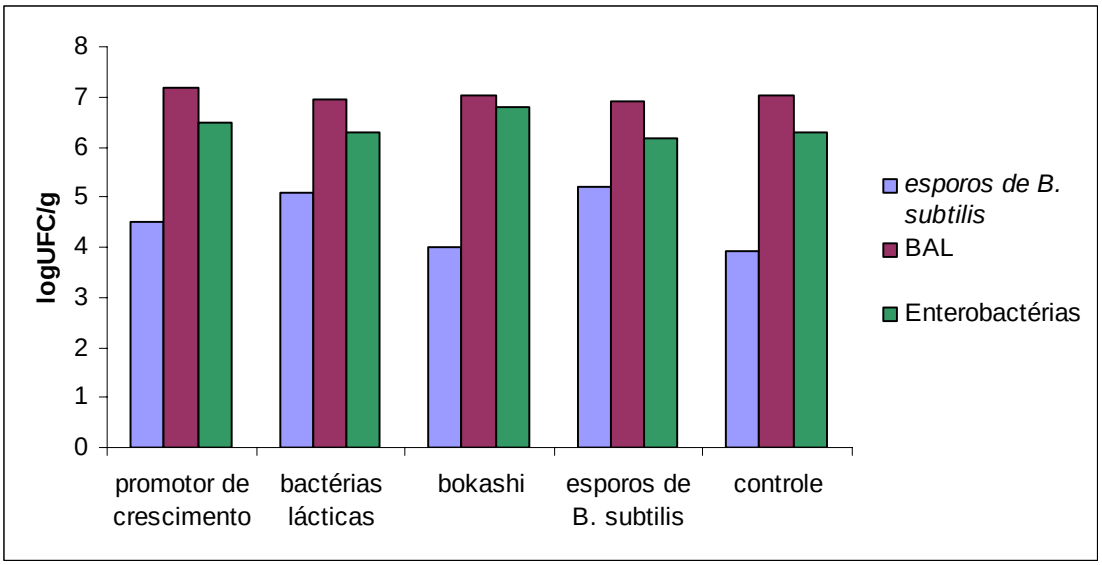

Figura 6 - Comparações entre grupos de microrganismos presentes em cecos de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos na ração

Conforme pode ser melhor visualizado nas Figuras 6 e 7, as populações de bactérias ácido lácticas foram maiores tanto que das enterobactérias quanto de esporos de *B. subtilis*, tanto nos cecos quanto nos papos dos frangos de corte analisados, em todos os tratamentos. Também,

comparando-se as populações de enterobactérias e BAL nos cecos, a população foi menor do que nos papos, onde se nota que as BAL atingiram contagens da ordem de 1 ciclo logarítmico maiores que as enterobactérias. De fato, nos papos as BAL são a microbiota dominante, estando presentes em número maior que os outros microrganismos, enquanto nos cecos existe uma diversidade muito grande de microrganismos, incluindo as BAL e as enterobactérias, que não fazem parte da microbiota dominante neste habitat (GUAN et al., 2003; LU et al., 2003).

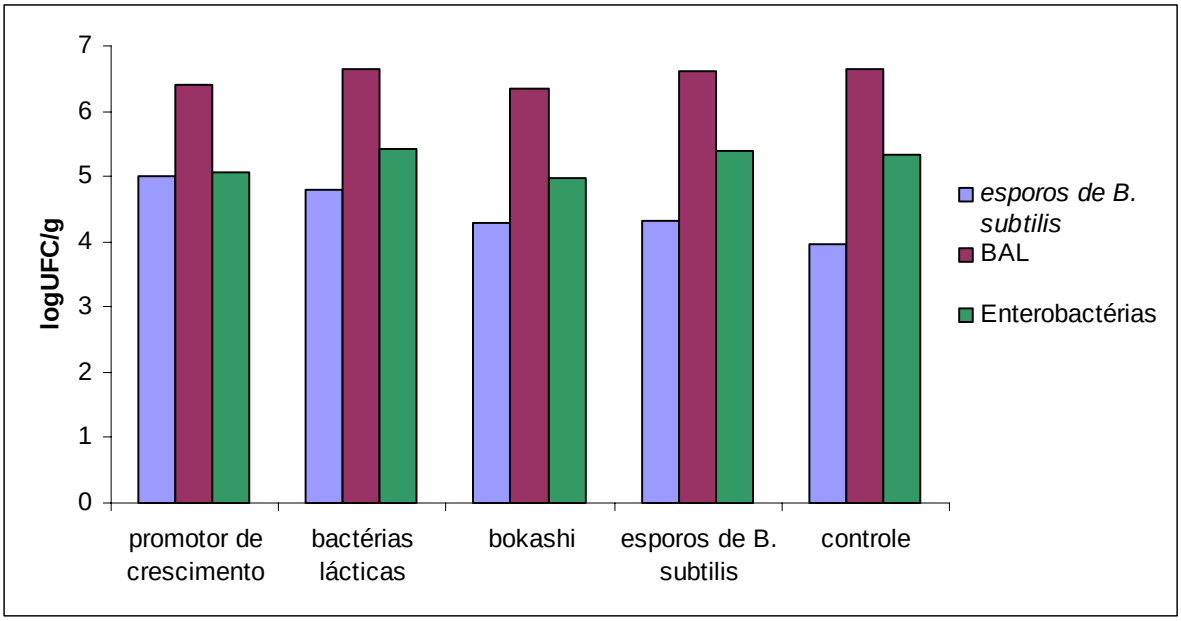

Figura 7 - Comparações entre grupos de microrganismos presentes em papos de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos na ração

De acordo com a Figura 8, é possível observar que a contagem de esporos de *B. subtilis* nos cecos e papos dos frangos analisados possui certa homogeneidade, estando entre 4 e 5 $\log_{10}$UFC/g, aproximadamente, em todos os tratamentos. Nos cecos, o tratamento com *B. subtilis* obteve contagem maior de esporos deste microrganismo em relação aos outros tratamentos, enquanto nos papos a maior contagem de *B. subtilis* aconteceu no tratamento que recebeu promotor de crescimento.

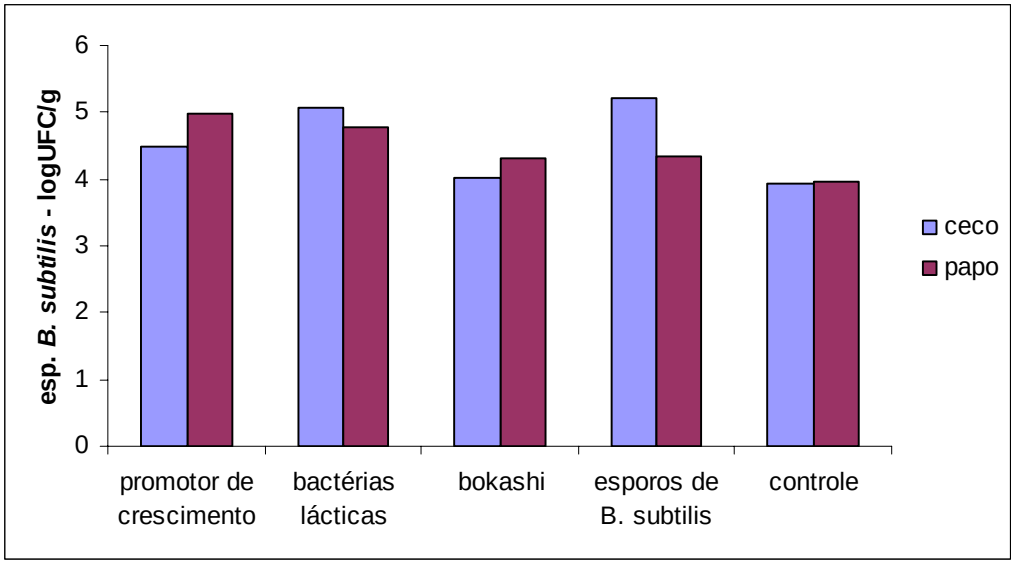

Figura 8 - Comparações entre contagens de esporos *B. subtilis* em papos e cecos de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos na ração

Mulder, Havenaar e Huis in't Veld (1997) em experimentos com probióticos disponíveis comercialmente, incluindo alguns que tinham em sua formulação *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. toyoi* concluíram que estes não afetam a colonização por microrganismos patogênicos, bem como o peso das aves analisadas.

É consenso entre autores, como Spinosa et al. (2000), que bactérias do gênero *Bacillus* não fazem parte da microbiota natural do intestino dos mamíferos, ou de outros animais, pois se trata de um ambiente anaeróbio e os *Bacillus subtilis* são aeróbios obrigatórios. Apesar disso, existem evidências de que cepas de *B. subtilis* podem persistir por até 36 dias no intestino de aves. De fato, apesar de o ceco ser um ambiente anaeróbio, foram recuperadas contagens bastante elevadas de esporos de *B. subtilis* em todos os tratamentos estudados, demonstrando que esse microrganismos é encontrado comumente nos intestinos das aves. Hong, Duc e Cutting (2005), e Barbosa et al. (2005) isolaram esporos de diversas espécies de *Bacillus*, incluindo *B. subtilis*, de fezes de aves criadas de forma orgânica. No presente trabalho, esporos de *B. subtilis* foram encontrados nos cecos e papos dos frangos de corte analisados, em todos os tratamentos, contrariando a hipótese de Spinosa et al. (2000), e indicando que há certa persistência desses esporos no ambiente do TGI de frangos de corte, podendo ser sugestivo da presença de células vegetativas. Ainda segundo que Spinosa et al. (2000), os efeitos probióticos de espécies de *Bacillus* se devem justamente a seus esporos, que podem germinar em órgãos linfóides,

estimulando o sistema imunológico e, portanto, seu crescimento ocorre fora do intestino. Isso pode ter ocorrido no presente estudo, visto que não se analisou esse aspecto. O que pode ser afirmado é que inexistiu efeito sobre o equilíbrio da microbiota do ceco e do papo. Por outro lado, visto que as contagens de esporos de *B. subtilis* foram elevadas e semelhantes em todos os tratamentos, é questionável a administração dos seus esporos na ração, salvo se a linhagem específica possuir alguma característica selecionada no sentindo de exercer alguma ação como a citada pelos autores.

5 CONCLUSÕES

1- Os tempos de jejum alimentar empregados (3, 6, 9, 12, 15 e 18 h) não causaram alterações significativas nas populações de enterobactérias no papo e no ceco dos frangos.

2- No tempo de jejum alimentar de 3 horas, a contagem de enterobactérias foi significativamente maior no ceco do que no papo. Nos demais períodos isto não ocorreu, o que pode ser atribuído à diminuição da capacidade natural do papo em inibir o crescimento das enterobactérias, com a privação de alimentos.

3- A população de enterobactérias no ceco foi significativamente menor no tratamento com bactérias ácido lácticas (BAL) do que no controle, enquanto os tratamentos com Bokashi e antibiótico apresentaram contagens maiores que o controle. Já o tratamento com esporos de *B. subtilis* não mostrou diferenças em relação ao controle.

4- O tratamento com administração de BAL não diferiu significativamente na população de bactérias lácticas no ceco em relação ao controle, apesar de causar redução significativa na população de enterobactérias no ceco. A inibição pode ter sido causada pela ação específica das linhagens utilizadas, através de seus metabólitos.

5- Em nenhum tratamento com aditivos houve diferenças significativas em relação ao controle na população de enterobactérias no papo.

6- As contagens de esporos de *B. subtilis* não diferiram significativamente, tanto no ceco quanto no papo no controle e nos demais tratamentos, o que não justificaria sua inclusão como probiótico na ração, exceto se for uma linhagem selecionada com ação específica.

7- Em nenhuma etapa da pesquisa houve isolamentos de *Salmonella*, o que pode ser atribuído ao sistema de criação com baixa densidade de aves e sem reaproveitamento de cama.

REFERÊNCIAS

ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. Residues of antimicrobial drugs and feed aditives in animal products: regulatory aspects. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 59, p. 183-198, 1999.

BALEVI, T.; AN, U.S.U.; COSKUN, B.; KURTOGLU, V.; ETINGÜL, T.S. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response. **British Poultry Science**, London, v.42, p. 456-461, 2001.

BARBOSA, T.M.; SERRA, C.R.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J.; HENRIQUES, A.O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 968-978, 2005.

BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BOEKHORST, J.; SIEZEN, R.J.; ZWAHLEN, M.; VILANOVA, D.; PRIDMORE, R.D.; MERCENIER, A.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M.; BRÜSSOW, H.; DESIERE, F. The complete genomes of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus johnsonii reveal extensive differences in chromosome organization and gene content. **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 3601-3611, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº210, de 10/11/1998**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br. Acesso em: 20 Fev. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº11, de 29/01/2004**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br. Acesso em: 20 Fev. 2006.

COLLIGNON, P.; WEGENER, H.C.; BRAAM, P.; BUTLER, C.D. The routine use of antibiotics to promote animal growth does little to benefit protein undernutrition in the developing world. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 41, p. 1007-1013, 2005.

CORRIER D.E.; BYRD, J.A.; HARGIS, B.M.; CALDWELL, D.J.; BAILEY, R.H.; HERRON, K.L.; MCREYNOLDS, J.L.; BREWER, R.L.; ANDERSON, R.C.; BISCHOFF, K.M.; CALLAWAY, T.R.; KUBENA, L.F. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, n. 3. p. 278-283, Mar. 2001.

DAHAL, B.K. Effective Microorganisms (EM) for animal production. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON KYUSEI NATURE FARMING, 6, 1999, Pretoria. **Proceedings…** Bangkok: APNAN, 2001. p. 156-162.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In:_____. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**: microbiology, genetics and application. Oxford: Chapman & Hall, 1994, p. 91-142.

DEMATTÊ FILHO, L.C.; MENDES, C.M.I. Viabilidade técnica e econômica na criação alternativa de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001. p. 255-266.

DENADAI, J.C.; MENDES, A.; GARCIA, R.G.; ALMEIDA, I.C.L.; MOREIRA, J.; OLIVEIRA, E.G.; TAKITA, T.S.; ROÇA, R.O. Efeito do tempo de jejum pré abate sobre o rendimento de carcaça e a qualidade da carne de peito de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Brasília: SBZ, 2001. p. 394-395.

DENADAI, J.C.; MENDES, A.; GARCIA, R.G.; ALMEIDA, I.C.L.; MOREIRA, J.;TAKITA, T. S.; PAVAN, A.C.; GARCIA, E.A. Efeito da duração do período de jejum pré-abate sobre rendimento de carcaça e qualidade da carne do peito de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 101-109, Maio/Ago. 2002.

DONOGHUE, D.J. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 618-621, 2003.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

DUC, L.H.; HONG, H.A.; BARBOSA, T.M.; HENRIQUES, A.O.; CUTTING, S.M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 2161-2171, 2004.

DUKE, G.E. Digestão nas aves. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

EHRMANN, M.A.; KURZAK, P.; BAUER, J.; VOGEL, R.F. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotics adjuncts in poultry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 966-975, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION **Bad bug book** – *Salmonella* spp., 1992. Disponível em <http://www.fda.gov>. Acesso em: 12 Dez. 2005.

GARRIGA, M.; PASCUAL, M.; MONFORT, J.M.; HUGAS, M. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 125-132, 1998.

GIL DE LOS SANTOS, J.R.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 741-747, Maio/Jun. 2005.

GREEN, D.H.; WAKELEY, P.R.; PAGE, A.; BARNES, A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S.M. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 95, n. 9, p. 4288-4291, 1999.

GUAN, L.L.; HAGEN, K.E.; TANNOCK, G.W.; KORVER, D.R.; FASENKO, G.M.; ALLISON, G.E. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6750-6757, 2003.

GUO, F.C.; WILLIAMS, B.A.; KWAKKEL, R.P.; LI H.S.; LI, X.P.; LUO, H.Y.; LI, W.K.; VERSTEGEN, M.W.A. Effects of mushroom and herbs polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on the cecal microbial ecosystem in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 175-182, 2004.

GUTIERREZ-COGCO, L.; MONTIEL-VASQUEZ, E.; AGUILERA-PÉREZ, P.; GONZÁLEZ-ANDRADE, C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. **Salud Pública de México**, México, v. 42, n. 6, p. 490-495, Nov./Dec. 2000.

HINTON, A.J.; BUHR, R.J.; INGRAM, K.D. Physical, chemical, and microbiological changes in the ceca of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p .483-488, 2000a.

HINTON, A.J.; BUHR, R.J.; INGRAM, K.D. Reduction of Salmonella in the crop of broiler chickens subjected to feed withdrawal. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 11, p. 1566-1570, 2000b.

HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics**.** **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 813-835, 2005.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos:** características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1996. 612 p.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 1259-1265, 1998.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 886-891, 2000.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 69-82.

LAN, P.T.N.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 48, n. 12, p. 917-929, 2004.

LANCINI, G.; PARENTI, F.; GALLO, G.G. **Antibiotics:** a multidisciplinary approach. New York: Plenum Press, 1995. 278p.

LANCINI, J.B. Fatores exógenos na função gastrintestinal – aditivos. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS – **Fisiologia da digestão e absorção das aves.** Campinas, 1994, p. 10-15.

LODDI, M.M.; GONZALES, E. TAKITA, T.S.; MENDES, A.A.; ROÇA, R.O. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n.4, p. 1124-1131, 2000.

LU, J.; IDRISS, 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**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003.

LYON, C.E.; PAPA, C.M.; WILSON R.I.. Effect of feed withdrawal on yields, muscle pH and texture of broilers breast meat. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, p. 1020-1025, 1991.

MACARI, M.; FURLAN, R.L. Probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, 2005. **Anais...** Campinas: FACTA, 2005. p. 53-71.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; NAKAGHI, L.O. Anatomia e histologia funcional do trato digestivo. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS – **Fisiologia da digestão e absorção das aves.** Campinas, 1994. p. 1-5.

MCLELLAND, J. Sistema digestivo das aves. In: GETTY, R. **Sisson/Grssman**: anatomia dos animais domésticos. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 174-178.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotics. **Feed Mix**, Doetinchem, v. 8, p. 6-11, Nov. 2000 Special.

MENDES, A.A. Jejum pré-abate em frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 3, p. 199-209, 2001.

MENTEN, J.F.M.; PEDROSO, A.A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2005, p. 41-52.

MULDER, R.W.A.W.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. In: FULLER, R. **Probiotics 2**: applications and practical aspects. London: Chapman & Hall, 1997. p. 160-200.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry.** 9th ed. Washington: National Academic Press, 1994. 155 p.

NORTHCUTT, J.K.; BUHR, R.J.; BERRANG, M.E.; FLETCHER, D.L. Effects of replacement finisher feed and length of feed withdrawal on broiler carcass yield and bacteria recovery. **Poultry Science**, Champaign, v.82, n.11, p.1820-1824, Nov. 2003a.

NORTHCUTT, J.K.; BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Effect of broiler age, feed withdrawal, and transportation on levels of coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on carcasses before and after immersion chilling. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 169-173, 2003b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance:** scientific assessment. Geneva, 2003. 38 p.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 627-631, 2003.

PEDROSO, A.A. **Estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento**. 2003. 103 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? – A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 53, p. 28-52, 2004.

RAMIREZ, G.A.; SARLIN, L.L.; CALDWELL, D.J.; YEZAK, C.R.; HUME, M.E.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R.; HARGIS, B.M. Effect of feed withdrawal on the incidence of Salmonella in the crops and ceca of market age broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 4, p. 654-656, Apr. 1997.

RICKE, S.C. The gastrointestinal tract ecology of S*almonella* enteritidis colonization in molting hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 1003-1007, 2003.

ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130. p. 396S-402S, 2000.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; RODRIGUES, D.P.; REIS, E.M.F.; SEKI, L.M.; RIBEIRO, A.R.; FERNANDES, S.A. Phage types of *Salmonella enteritidis* isolated from clinical and food samples and from broiler carcasses in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 1-4, Jan./Fev. 2003.

SCHNEITZ, C. Competitive exclusion in poultry – 30 years of research. **Food Control**, Guildford, v. 16, p. 657-667, 2005.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, p. 361S-364S, 2001. Supplement.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella enteritidis* em aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, maio 2002.

SPINOSA, M.R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; FELICE, M.; MORELLI, L.; POZZI, G.; OGGIONI, M.R. On the fate of ingested *Bacillus* spores. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 361-368, 2000.

SUNDE, M.L.; DAFWANG, I.; COOK, M.E.; BIRD, H.R. Facts about antibiotics in poultry feed still missing**. Feedstuffs**, Minnetonka, v. 62, p. 35-39, 1990.

TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals: prejudices, perceptions and realities. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 53, p. 26-27, 2004.

VEERKAMP,C.H. Fasting and yield of broilers. **Poultry Science,** Champaign, v. 65, p. 1299-1304, 1986.

WARRIS, P.D.; BEVIS, E.A.; BROWN, S.N. Time spent by broiler chickens in transit to processing plants. **The Veterinary Record**, London, v. 127, p. 617-619, 1990.

WIELLEN, P.W.J.J. van der; KEUZENKAMP, D.A.; LIPMAN, L.J.A.; KNAPEN, F. van; BIESTERVELD, S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercial raised broiler chicken broiler chickens during growth. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p. 286-293, 2002.

ZACCONI, C.; SCOLARI, G.; FRAIOLI, D.; SARRA, P.G. Colonization of chicken intestinal tract by *Lactobacillus salivarius* A 23 strain. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v. 49, p. 103-115, 1999.

ZHU, X.Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y.; JOERGER, R.D. 16-s RNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n.1, p. 124-137, 2002.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo