

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SINERGISMO ENTRE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS E
Lactobacillus acidophilus NA INIBIÇÃO DE
Salmonella enteritidis E *Salmonella gallinarum*

Tammy Priscilla Chioda Delfino
Tecnóloga em Alimentos

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SINERGISMO ENTRE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS E
Lactobacillus acidophilus NA INIBIÇÃO DE
Salmonella enteritidis E *Salmonella gallinarum*

Tammy Priscilla Chioda Delfino

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2008

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TAMMY PRISCILLA CHIODA DELFINO - nascida em 08 de abril de 1977, natural de Jaboticabal, São Paulo, graduou-se em Tecnologia em Alimentos pela Universidade Federal Tecnológica do Paraná, campus de Medianeira - Paraná, em 2001. Em 2005 obteve o título de mestre em Microbiologia Agropecuária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal, São Paulo. Em agosto de 2005, Iniciou o curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na mesma instituição. Atualmente é professora efetiva do Colégio Técnico Agrícola “José Bonifácio” - UNESP, campus de Jaboticabal, São Paulo na disciplina de Processamento de Produtos Agropecuários e Industrialização Agropecuária.

Aos meus queridos e amáveis pais **Arlindo** e **Fátima**, que sempre me apoiaram com palavras, atos de carinho e amor, nunca mediram esforços para me ajudar, a vocês meu amor e eterna gratidão.

Ao meu irmão Lucas, que sempre torceu por mim.

Minha tia Maria Helena, sempre presente em todos os momentos.

Dedico

Ofereço

A minha doce e amada filha **Laura**, meu maior estímulo desta caminhada, companheirinha, a você minhas bênçãos, minhas alegrias e minhas conquistas.

Ao meu esposo **Jailson**, pelas vezes que não entendeu minhas ausências, mas sempre respeitou meus objetivos, obrigada pelo nosso verdadeiro amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me tornado mais sensível ao amor e ao carinho nos momentos em que mais precisei. Agradeço a TI, por orientar-me e sempre permitir que eu sempre seja forte e capaz. A Tua ajuda veio de diversas formas e muitas delas através de todos que agradeço nestas páginas.

Agradeço ao Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino pela oportunidade e orientação, apoio e estímulo ao longo deste trabalho. Agradeço pelas críticas suaves e profundas a ponto de me transformar positivamente. Sou sua admiradora e lhe tenho muito respeito e orgulho, sou grata pela confiança depositada em mim, por ter colaborado para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo, pela colaboração e atenção em todos os momentos que solicitei seu auxílio, por ter enriquecido meu trabalho e especialmente pela sua disponibilidade.

Aos professores Dr. Helio Montassier e Dr. Fernando Ávila, Profa Dra. Margareth Panobianco que colaboraram para a realização desta pesquisa, permitindo a utilização de seus equipamentos, os meus sinceros agradecimentos.

À Silvana Pelicano Berchieri, técnica do Laboratório de Microrganismos Anaeróbios, agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pelas risadas, muito obrigada.

Agradeço a Maria de Lourdes “Lurdinha”, sua sensibilidade em sempre ajudar, ao João Quintana em suas orientações nas horas de meu desespero, a Rosângela pelo sorriso em sempre que solicitada.

Aos meus amigos do Laboratório de Anaeróbios, agradeço pelos momentos que passamos juntos, pelos conhecimentos que fizemos multiplicar e pelo apoio dividido. Jamais esquecerei das brincadeiras e estatísticas do Juliano Vittori, da simpatia e constante auxílio da Mariana Beraldo, do companheirismo e amizade da Adriana Ragazani, pelo companheirismo e amizade da Gisela Garcia, pela sensibilidade e carinho da Gislaine Barbosa, pela força da Márcia, pela ajuda da Isabel, pelo apoio do César, pelo auxílio da Luciana Bedore. Agradeço a vocês na totalidade e pelo que cada um representa individualmente.

A Alessandra Aparecida Medeiros, pela sensibilidade e carinho que sempre demonstrou em permitir o uso das cepas.

Aos funcionários da Avicultura, Ligeiro, Cleber, aos funcionários da Fazenda, aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária: João, Teo, Cida, Moema, Claudinha (da Microscopia eletrônica), obrigada por ter colaborado, permitindo a realização deste trabalho.

Á Frango Sertanejo, pela assistência técnica e suporte de materiais.

Aos alunos do Colégio Técnico Agrícola “José Bonifácio”: Dione Costa e Silva, Lucas do Carmo, Etoze Venturini, Rodrigo Novelli, Wellington Baroni e Rafael Divino, a colaboração e o empenho de vocês foi fundamental para a realização de meu experimento, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Euclides Malheiros, agradeço pela colaboração nas análises estatísticas.

A secretária Edna Testa Dáquila, você se mostrou solidária nos momentos de apreensão em que sempre precisei na minha ansiedade.

As secretárias da pós-graduação, Isabel Buzinaro, Márcia, Márcia, Valeria, pela ajuda sempre que solicitada, terei vocês em meu pensamento toda vez que recordar esta etapa de minha vida.

A Caroline Peters Pigatto de Nardi, agradeço, por jamais ter dito não, por não ter medido forças em me ajudar e por suas infinitas intercessões. Agradeço pela nossa cumplicidade e amizade verdadeira, não esqueça que sou sua “dinda”.

Á medida que eu envelhecer ainda haverá muito a agradecer e por isso, obrigada por tudo, pelo que hoje reconheço e agradeço e pelo que amanhã minha sensatez permitira perceber, tornando-me ainda mais grata pelos benefícios recebidos.

SUMÁRIO

Itens	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Probióticos.....	4
2.2. Bactérias láticas.....	5
2.2.1. Gênero <i>Lactobacillus</i>	6
2.3. Bacteriocinas de bactérias láticas.....	8
2.4. Classificação.....	8
2.5. Modo de ação das bacteriocinas.....	10
2.5.1. Ação sobre células vegetativas.....	10
2.5.2. Ação sobre esporos.....	10
2.5.3. Nisina.....	12
2.6. <i>Salmonella</i> spp.....	12
2.6.1. Importância de <i>Salmonella</i> sp. para a indústria avícola.....	14
2.6.2. <i>Salmonella</i> Enteritidis em rações avícolas e roedores.....	15
2.6.3. Resistência antimicrobiana em amostras de <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	17
2.6.4. <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> em alimentos e surtos de infecção alimentar no Brasil.....	18
2.7. Antibióticos.....	20
2.8. Substâncias orgânicas que inibem a multiplicação de microrganismos: EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético e Acido acético.....	22
III. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivos Gerais.....	23

3.2. Objetivos específicos.....	23
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Ensaio experimental “in vitro”.....	24
4.1.1. Cepas e condições de crescimento.....	24
4.1.2. Testes de inibição do crescimento de <i>Salmonella</i>	25
4.1.3. Teste de antagonismo "spot-on-the-lawn"	25
4.1.4. Exclusão da ação de bacteriófagos líticos.....	26
4.1.5. Sensibilidade à protease de bacteriocinas produzidas pela cepa de <i>L. acidophilus</i>	26
4.2. Avaliação da cinética de multiplicação com substâncias antimicrobianas.....	27
4.2.1. Determinação da ação combinada de <i>Lactobacillus</i> com substâncias antimicrobianas sobre o crescimento “in vitro” de <i>Salmonella Enteritidis</i> e <i>Salmonella</i> <i>Gallinarum</i>	27
4.2.1.1. Efeito do EDTA em cultivo simples.....	28
4.2.1.2. Efeito inibitório sobre <i>Salmonella Enteritidis</i> e <i>Salmonella Gallinarum</i> isoladamente ou em combinação com substâncias antimicrobianas de isolados de <i>Lactobacillus acidophilus</i> C1 e ITAL SL- 199.....	28
4.2.1.3. Efeito de EDTA sobre <i>Salmonella enteritidis</i> e <i>Salmonella gallinarum</i> na presença de bacteriocina comercial (nisina)	29
4.3. Determinação do efeito do ácido acético.....	29
4.4. Ensaio experimental “in vivo”.....	30
4.4.1. Local e período experimental.....	30
4.4.2. Aves.....	30

4.4.3. Manejo das aves e condição de criação.....	30
4.4.4. Preparo das culturas de <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. acidophilus</i> C1.....	31
4.4.5. Delineamento experimental e tratamentos.....	31
4.4.6. Administração das cepas utilizadas e teste de desafio.....	31
4.4.7. Controle bacteriológico das aves.....	32
4.4.8. Colheita de amostras.....	32
4.4.8.1. Suabes cloacais.....	32
4.5. Procedimento microbiológico.....	32
4.5.1. Pesquisa de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> (APHA, 2001).....	32
4.5.1.1. Enriquecimento seletivo.....	33
4.5.1.2. Plaqueamento seletivo.....	33
4.5.1.3. Identificação presuntiva.....	33
4.6. Análise estatística.....	33
V. Resultados e Discussão.....	34
5.1. Avaliação da ação antimicrobiana “in vitro”.....	34
5.2. Efeito da sinergia entre as substâncias antimicrobianas e cepas Probióticas.....	36
5.3. Avaliação da multiplicação de <i>S. Gallinarum</i> com os reagentes: EDTA e ácido acético.....	39
5.4. Ação “in vivo”.....	41
VI. CONCLUSÕES.....	45
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	47
VIII. APÊNDICE.....	65

SINERGISMO ENTRE SUBSTANCIAS ANTIMICROBIANAS E *Lactobacillus acidophilus* NA INIBIÇÃO DE *Salmonella Enteritidis* E *Salmonella gallinarum*

RESUMO – A avicultura comercial tem como objetivo obter alta produtividade a baixo custo e oferecer ao consumidor produto de qualidade. Uma bactéria patogênica que tem preocupado o setor avícola nos últimos tempos é a *Salmonella*. Neste sentido, o presente trabalho objetivou caracterizar seis isolados de *Lactobacillus acidophilus* em combinação com antimicrobianos na inibição de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*. O experimento foi desenvolvido nas dependências da FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal. Para tanto foram conduzidos quatro estudos, sendo que dois foram dedicados em selecionar uma bactéria probiótica produtora de bacteriocina e avaliar a interação de substâncias antimicrobianas como EDTA, ácido acético e Nisina “in vitro” sobre a capacidade inibitória de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum* em diferentes tempos e o terceiro e quarto experimento estudam o potencial de aplicação do probiótico e do antimicrobiano em aves. O isolado de *Lactobacillus acidophilus* C1, demonstrou ser produtor de bacteriocina e inibir a multiplicação de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*. Dentre os antimicrobianos testados o que apresentou efeito na eliminação de *Salmonella Enteritidis* foi a combinação de Ácido Acético + nisina e Ácido Acético + *Lactobacillus acidophilus* C1. O uso do probiótico no estudo em aves reduziu a excreção de *Salmonella sp*, mas não sua eliminação no trato intestinal das aves, já que é possível constatar sua presença no tratamento controle. A combinação de nisina e ácido acético não levou a redução da multiplicação de *Salmonella sp*. nas aves. O estudo permitiu verificar que existe um bom potencial de aplicação do probiótico citado, assim como o uso de alguns antimicrobianos na segurança alimentar.

Palavras-chaves: Antimicrobianos, Bacteriocina, Probiótico, *Salmonella*, Avicultura

SYNERGISM BETWEEN ANTIMICROBIAL SUBSTANCES AND *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* IN THE INHIBITION OF *SALMONELLA SP*

SUMMARY – The commercial poultry aims at obtaining high productivity at low cost and offering quality products to the consumer. A pathogenic bacterium which has worried the poultry sector in recent times is *Salmonella*. Therefore, the present study aimed at characterizing six isolates of *Lactobacillus acidophilus* in combination with antimicrobials in the inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. The experiment was developed in the dependencies of FCAV/UNESP – Campus of Jaboticabal. In order to do this, four studies were conducted, being two of them dedicated to select a bacteriocin-producer probiotic bacterium and evaluate the interaction of antimicrobial substances such as EDTA, acetic acid and “in vitro” Nisin on the inhibitory capacity of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum* in different periods and the third and fourth experiment study the potential of application of the probiotic and antimicrobial in poultry. The isolate of *Lactobacillus acidophilus* C1, showed to be bacteriocin producer and inhibit the multiplication of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. Among the antimicrobial tested, the one which presented effect in the elimination of *Salmonella enteritidis*, was the combination of Acetic Acid + nisin and Acetic Acid + *Lactobacillus acidophilus* C1. The use of the probiotic in the study of birds reduced the counting of *Salmonella sp*, but not its elimination in the intestinal tract of the birds, as we can see its presence in the control treatment. The combination of nisin and acetic acid did not show the reduction of the multiplication of *Salmonella sp*. in birds. The study has shown that there is a good potential of application of the mentioned probiotic, as well as the use of some antimicrobial in food safety.

Keywords: Antimicrobials, Bacteriocin, Probiotic, *Salmonella*, Poultry

"Não tema avançar lentamente; receie apenas ficar parado", provérbio chinês.

I. INTRODUÇÃO

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

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 de segurança e sanidade dos alimentos, causadas por doenças de animais como a síndrome da "vacca louca", a febre aftosa, a gripe aviária tem atraído a atenção dos consumidores.

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

Do ponto de vista sanitário, as aves são susceptíveis à infecção por diversos agentes patogênicos, capazes de causar dano à saúde pública. Entre esses agentes, destacam-se as bactérias do gênero *Salmonella* que podem estar presentes no ambiente avícola de modo generalizado.

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 na Suécia e, logo depois pela Dinamarca (MELLOR, 2000). A Europa pretende banir os antimicrobianos na criação de aves, pois a União Européia adotou proibições em 1999 banindo os antibióticos avorpacina, tilosina, bacitracina, virginiamicina e proibindo o uso das substâncias monensina e salinomicina como promotores de crescimento (DEMATTE-FILHO: MENDES, 2001).

Existe hoje uma preocupação com doenças entéricas em frangos, bem como com o uso exacerbado de antibióticos durante o ciclo de criação. As doenças entéricas recebem preciosa 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 frequência 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 adequado.

Com o crescente número de probióticos que atualmente vêm sendo produzidos, faz-se necessário o controle de qualidade e a verificação da eficácia destes produtos. Diversas bactérias como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli* são utilizadas como probióticos, associados ou não.

Algumas espécies de *Lactobacillus* spp. podem, transformar a lactose em ácido láctico (homo fermentativas), enquanto outras, além de ácido láctico também originam etanol, acetato e dióxido de carbono (heterofermentativas). O aumento do ácido láctico diminui o pH intestinal, dificultando a sobrevivência de microrganismos patogênicos. Podem também produzir peróxido de hidrogênio, responsável pela inibição do crescimento de certas bactérias anaeróbias, além de bacteriocinas, cuja ação antimicrobiana pode inativar, ou matar outras espécies bacterianas.

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

Devido a essas vantagens, como também à sua tradicional utilização na produção de alimentos fermentados, as bactérias ácido-láticas vêm sendo intensamente estudadas, pois as pesquisas sobre a fisiologia, bioquímica, genética e

biologia molecular desses microrganismos tiveram um avanço significativo, permitindo a detecção da produção de substâncias promotoras de antibioteses como as bacteriocinas.

Estudos de MEDEIROS, 2002, verificaram um ótimo potencial de inibição de *Lactobacillus acidophilus* frente a bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens* (causador de enterite necrótica), *Salmonella* e *E.coli*.

As bacteriocinas das bactérias ácido lácticas são em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas, apresentando de 30 a 60 resíduos de aminoácidos, e que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e as suas propriedades bioquímicas.

A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* é a bacteriocina melhor caracterizada atualmente. É a única bacteriocina aprovada internacionalmente e legalizada para utilização em alimentos. Sendo considerada não tóxica para seres humanos, pois é rapidamente inativada pela α -quimiotripsina, enzima produzida no pâncreas e liberada no intestino delgado.

A sensibilidade das bacteriocinas de *Lactococcus lactis* à degradação por enzimas proteolíticas é bastante interessante com respeito à segurança alimentar, uma vez que a ingestão de bacteriocinas não promove alterações na ecologia do trato digestivo. Não apresentando, dessa forma, os mesmos riscos relacionados ao uso de antibióticos. Contudo, estudos toxicológicos são necessários para os novos tipos de bacteriocinas para sua aprovação como conservadores de alimentos.

Em 1998, isolou-se no Laboratório de Anaeróbios, pertencente ao Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal-SP, cepas de *Lactobacillus acidophilus* proveniente de aves (MEDEIROS,1998). Posteriormente, essas cepas foram peças-chave de várias pesquisas para determinar seu caráter de inibição frente a bactérias patogênicas (GARCIA, 2006 e CHIODA, 2005) e caracterização do mecanismo de ação. Com isso, vários trabalhos estão sendo desenvolvidos, dentre os quais este com o objetivo de prosseguir esta linha de pesquisa e atribuir propriedades específicas a estes isolados.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Probióticos

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida” e tem sido utilizado de maneira diversa ao longo dos últimos anos.

A definição mais utilizada para 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 benéficamente o hospedeiro animal pela melhora de seu balanço microbiológico intestinal”.

Analisando estas 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 de microrganismo e o hospedeiro (um animal). A conclusão foi que probiótico é “uma preparação ou um produto, contendo microrganismos viáveis e definidos em número suficiente, que alteram a microbiota (por implantação ou colonização) em uma parte do trato gastro-intestinal 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 um estudo em que postulava que a ingestão de bactérias ácido-láticas tinha influencia positiva na microbiota natural do trato intestinal (ROLFE, 2000).

Segundo PATTERSON E BURKHOLDER (2003), desde que foi feito este 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 adicao de probioticos aumenta a resistência a eles. 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.

HONG, DUC e CUTTING (2005), classificam a utilização dos 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 alternativos a antibióticos e, portanto utilizados como promotores de crescimento. A maioria dos probióticos comercializados possui uma ou mais espécies de bactérias ácido-láticas (BAL) principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. BALEVI (2001), ainda citam *Streptococcus* como uma espécie muito utilizada em preparações probióticas.

Segundo DALE (1992), apud PEDROSO (2003), a base para a utilização dos 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, 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.

Segundo EHRMANN et al., (2002) e JIN et al., (2000), existem dois mecanismos possíveis para os benefícios das BAL como probióticos: a capacidade de produzir substâncias como ácido lático e bacteriocinas; e a capacidade de aderir á mucosa do TGI e formar uma barreira contra a colonização por patógenos.

2.2. Bactérias lácticas

Bactérias lácticas (BAL) é um grupo de microrganismos com padrões morfológicos, metabólicos e fisiológicos comuns. Na definição mais aceita, as BAL são caracterizadas como bactérias Gram - positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, tendo o ácido lático como principal produto de fermentação de carboidratos

(AXELSSON, 1993). Segundo STILES e HOLZAPFEL (1997), neste grupo estão compreendidos 11 gêneros com grande importância em alimentos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*.

As BAL podem apresentar atividade inibitória frente a outras bactérias, decorrente da competição por nutrientes e/ou produção de compostos antagonistas como ácido máltico, diacetil, peróxido de hidrogênio e peptídeos antimicrobianos chamados bacteriocinas (MONTVILLE e KAISER, 1993; NILSEN et al., 1998; SIMON et al., 2002). Visto que as BAL são consideradas seguras, suas bacteriocinas tornaram-se foco de estudos devido ao seu potencial de aplicação como conservantes naturais (NES e JOHNSBORG, 2004).

Na Tabela 1, estão listadas diversas cepas de BAL produtoras de bacteriocina.

Tabela 1 - Exemplos de bactérias lácticas e suas respectivas bacteriocinas.

LINHAGEM PRODUTORA	BACTERIOCINA
<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	Nisina
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb 706	Sakacina A
<i>Lactobacillus sakei</i> 148	Sakacina M
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	Bavaricina A
<i>Leuconostoc carnosum</i> B-TA 11a	Leucocina B-TA 11a
<i>Carnobacterium divergens</i> 750	Divergicina 750
<i>Pediococcus acidilactici</i> L 50	Pediocina L50

Fonte: Modificado por De MARTINIS et al., 2002.

2.2.1. Gênero *Lactobacillus*

O gênero compreende 56 espécies oficialmente reconhecidas, as mais utilizadas para fins de aditivo dietético são *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. O *L. acidophilus*, o mais comum, é um bacilo gram - positivo com pontas arredondadas, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas (Figura 1), com

tamanho típico de 0.6-0.9 μm de largura e 1.5-6.0 μm de comprimento. Esta espécie tem a particularidade de ser pouco tolerante à salinidade do meio, e ser microaerofílico, com o crescimento em meios sólidos favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio. Uma grande parte das estirpes de *L. acidophilus*, degradam: amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glucose, lactose, maltose, manose, sucrose e esculina (NAHAISI, 1986) As condições ótimas para a sua multiplicação eficaz são temperaturas de 35-40 $^{\circ}\text{C}$ e valores de pH de 5.5-6.0. Deve salientar-se que o crescimento de *L. acidophilus* pode ocorrer a 45 $^{\circ}\text{C}$, e que a sua tolerância em termos de acidez do meio varia entre 0.3 e 1.9 $\%(\text{v/v})$ de acidez titulável. Os lactobacilos estão distribuídos por vários nichos ecológicos espalhados pelos tratos gastrointestinal e genito-urinário, constituindo, de forma semelhante às bifidobactérias, uma fração importante da microflora natural. Tal distribuição é afetada por vários fatores ambientais, incluindo o pH, a disponibilidade de oxigênio, o nível de substratos específicos e a presença de secreções e interações bacterianas (SALMINEN et al., 1996).

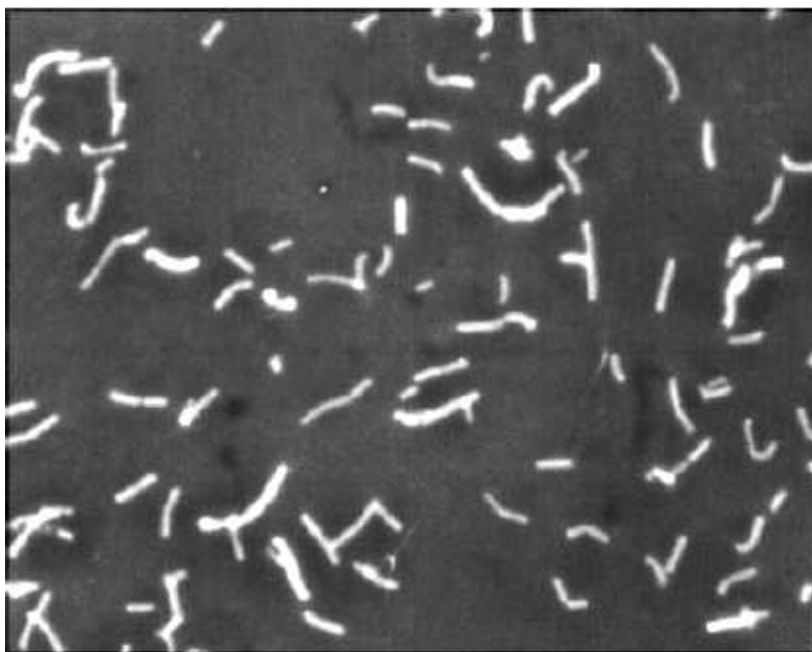


Figura 1 - Fotomicrografia de *Lactobacillus acidophilus* cultivado em TGV ágar durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

2.3. Bacteriocinas de bactérias lácticas

As bacteriocinas formam um grupo heterogêneo de compostos antimicrobianos, de natureza peptídica apresentando de 20 a 60 resíduos de aminoácidos com características anfipáticas e ponto isoelétrico elevado. São produzidas por um grande número de espécies bacterianas, variando quanto ao modo de ação, espectro de atividade, massa molecular, propriedades bioquímicas e origem genética (CAROLISSEN-MACKAY et al., 1997).

O alvo principal das bacteriocinas de BAL são as bactérias Gram-positivas, podendo atuar frente a bactérias da mesma espécie do organismo produtor (estreito espectro de atividade) ou frente a bactérias de outro gênero (amplo espectro de atividade) (COTTER et al., 2005).

As bacteriocinas produzidas por BAL são distintas dos antibióticos. Há diferenças entre antibióticos e bacteriocinas quanto à síntese, aplicação espectro antimicrobiano, modo de ação, mecanismos de resistência, toxicidade e microrganismos produtores (MONTVILLE e KAISER, 1993; CLEVELAND et al.; 2001). Na tabela 2, estão apresentadas as principais diferenças entre antibióticos e bacteriocinas de BAL.

Tabela 2 - Principais diferenças entre bacteriocinas de BAL e antibióticos.

CARACTERÍSTICAS	BACTERIOCINAS DE BAL	ANTIBIÓTICOS
Síntese	Ribossômica	Via enzimática
Aplicação	Alimentos	Clínica
Espectro antimicrobiano	Limitado	Amplo
Modo de ação	Membrana citoplasmática	Diversos
Resistência microbiana	Foram encontradas cepas resistentes	Foram encontradas cepas resistentes
Toxicidade	Nenhuma conhecida	Diversas
Microrganismos produtores	Bactérias lácticas	Principalmente bolores

Fonte: Modificado por CLEVELAND et al.; 2001.

2.4. Classificação

Inicialmente, KLAENHAMER (1998) diferenciou as bacteriocinas de BAL conforme o seu espectro de ação, dividindo-as em dois grupos. Em um grupo foram colocadas as bacteriocinas com um estreito espectro de ação, ativas apenas contra bactérias pertencentes ao mesmo gênero. Helveticina J, lactocina 27 e diplocina são exemplos dessa classe de bacteriocina. Já o segundo grupo era composto por bacteriocinas com amplo espectro de ação, como nisina, leuconocina S e pediocina. Esse mesmo autor propôs uma nova classificação para esses compostos, dividindo-as em quatro classes, com bases em suas características estruturais e físico-químicas. A classe I foi subdividida em Ia e Ib. Todas as bacteriocinas da classe I apresentam em comum a massa molecular (<5 kDa) e a presença dos aminoácidos lantionina e beta-metil-lantionina. Na classe Ia, que tem como representante a nisina, estão os peptídeos catiônicos e hidrofóbicos com flexibilidade estrutural quando comparados aos da classe Ib, que são mais rígidos. A classe Ib, engloba peptídeos globulares sem carga ou com carga negativa, sendo a mersacidina, um exemplo desses inibidores. A classe II contém peptídeos não modificados e termoestáveis, podendo, ainda ser subdividida em IIa e IIb. A classe IIa inclui peptídeos ativos contra *Listeria spp.*, por exemplo, a pediocina PA1 e as sakacinas A e P. Diversos peptídeos dessa subclasse apresentam atividade antilisterial (NILSSON et al., 2002). A classe IIb, apresenta um sistema de dois componentes, sendo necessários dois peptídeos para formação de um complexo ativo, sendo esta classe exemplificada pelas plantaricinas EF e JK, lactocinas G e F. A classe III, é composta por moléculas grandes e sensíveis ao calor e como exemplos, temos as lactacinas A e B, helveticinas J e V-1829. Finalmente, a classe IV, que seria formada por bacteriocinas complexas, compostas por proteínas e uma ou mais moléculas de lipídeos ou carboidratos, sendo a pediocina SJ1 representante dessa classe.

COTTER et al., 2005, revisaram e apresentaram um novo esquema de classificação. Esta nova proposta divide as bacteriocinas em duas categorias distintas:

Classe I: formada pelas bacteriocinas que contém lantionina. Neste grupo diferenciam-se os lantibióticos simples, formados por um peptídeo (ex: nisina, mersacidina e lactocina 481) e lantibióticos duplos, formados por dois peptídeos (lactocina 3147, citolisina).

Classe II: formada pelas bacteriocinas que não contém lantionina. Esta classe foi subdividida em Classe IIa: bacteriocinas tipo-pediocina (ex: pediocina PA1, leucocina A); Classe IIb : bacteriocinas formadas por dois peptídeos (ex: lactacina F); Classe IIc : bacteriocinas cíclicas (ex: Enterocina AS, reutericina 6) e Classe IId: peptídeos lineares simples diferentes da pediocina (ex: Lactococina A , divergicina A).

Além disso, estes autores designaram como Bacteriolisinas as bacteriocinas da classe III proposta por KLAENHAMMER 1993, baseando-se nas diferenças de tamanho, estabilidade térmica, mecanismo de ação, estrutura e genoma destas em relação às verdadeiras bacteriocinas. Como por exemplo, de bacteriolisinas, citaram as lisostafina e enterolisina A.

2.5. Modo de ação das bacteriocinas

2.5.1. Ação sobre células vegetativas

Os mecanismos de ação das bacteriocinas foram propostos a partir de modelos obtidos com os estudos das colicinas (TAGG et al., 1976). Assim como ocorre com as colicinas, sugere-se que as bacteriocinas ligam-se a receptores específicos da superfície celular das células suscetíveis, apesar do mecanismo exato ainda não ter sido elucidado (MONTVILLE e KAISER, 1993; MONTVILLE et al., 1995; DE MARTINIS et al., 2002). Diversos autores pesquisaram os mecanismos de ação das bacteriocinas sendo o princípio mais aceito baseado na ocorrência da dissipação da força próton-motriz como consequência da formação de poros na membrana citoplasmática que induz um desbalanço iônico e efluxo de íons fosfato, resultando na inativação ou morte celular (ROSA et al., 2002).

2.5.2 Ação sobre esporos

Comparado aos estudos do mecanismo de ação de bacteriocinas em células vegetativas, observam-se poucas informações da ação das bacteriocinas em esporos.

Mesmo assim, os estudos que empregaram nisina para determinação deste mecanismo indicaram uma atividade mais esporostática que esporocida (MONTVILLE et al., 1995). A nisina impede, principalmente, a germinação de esporos pela reação de grupos de dehidrobutirina e dehidroalanina com agrupamentos sulfidrílica de moléculas vitais da membrana (DE MARTINIS et al., 2002).

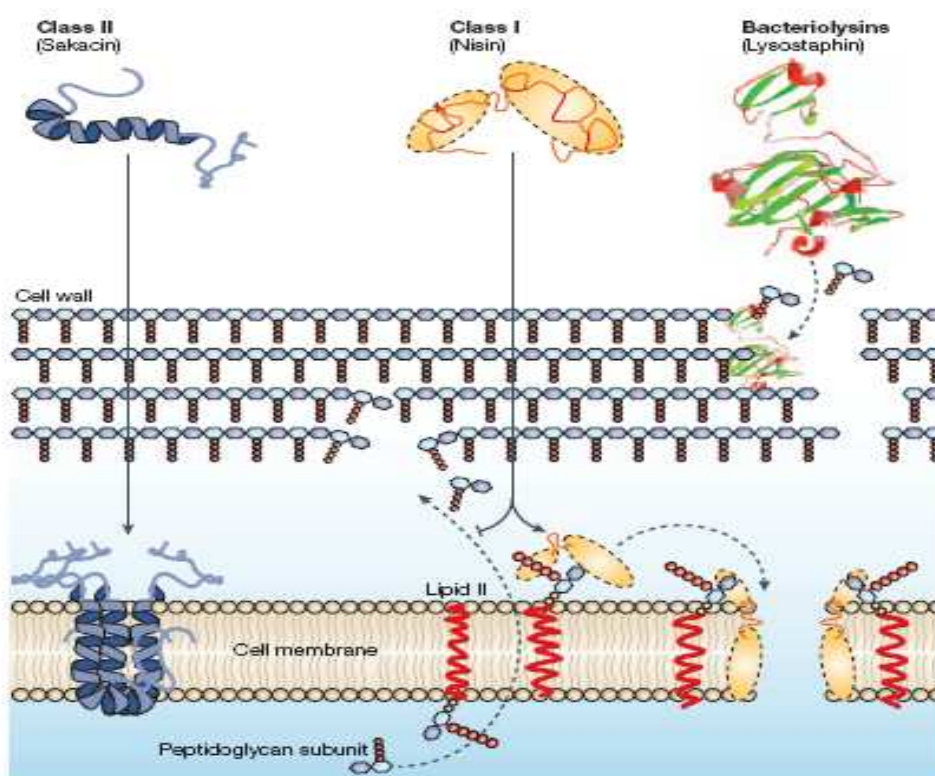


Figura 2. Representação esquemática de mecanismos de ação propostos para bacteriocinas da Classe I, Classe II e Bacteriolisinas da BAL (Fonte: Adaptado de COTTER et al., 2005).

2.5.3. Nisina

A nisina, conhecida desde 1928, é uma bacteriocina produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, e seu espectro de atividade inclui bactérias Gram positivas e seus esporos, apresenta ação inibitória comprovada frente à *Listeria*

monocytogenes, *Bacillus* sp, *Staphylococcus* sp e esporos de *Clostridium* sp. A nisina possui o status GRAS (“Generally Recognized As Safe”), sendo comprovada em mais de 40 países como conservador de alimentos há cerca de 50 anos (STEVENS et al., 1991; CHI-ZHANG et al., 2004). A nisina é a única bacteriocina com aplicação prática na indústria de alimentos. No entanto, sua utilização em produtos cárneos apresenta limitações, relacionadas à sua baixa solubilidade no pH da carne, forte interação com fosfolipídeos e inativação pela enzima glutatona S-transferase presente no músculo de bovino cru (DE MARTINIS et al., 2002).

2.6. *Salmonella* spp.

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

A salmonelose é uma zoonose de importância mundial. A ampla distribuição de espécimes do gênero salmonella entre os animais e sua permanência no ambiente, contribui para que este microrganismo assuma um papel importante em saúde pública como agente de origem alimentar (WEISS et al., 2002).

Os sorotipos de salmonellas paratífoides, tais como *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* acometem diversas espécies de animais e possuem significado em saúde pública, como agentes etiológicos da salmonelose humana (SOUSA et al., 2007).

As bactérias do gênero salmonella são bacilos Gram - negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São microrganismos anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríquios (exceto *Salmonella Enterica*, sorotipos *Pullorum* e *Gallinarum*). Esses microrganismos são quimiorganotróficos, têm crescimento ótimo a 37° C e podem sobreviver em temperaturas elevadas (≤ 54 °C) ou baixas (2 C a 4 C) salmonella

é capaz de multiplicar-se em valores de pH de 4,5 a 9,5, porém a faixa ótima é de 6,5 a 7,5 (D'AOUST et al., 2001).

A identificação da salmonela baseia-se principalmente em características bioquímicas, tais como fermentação de açúcares, produção de gás, etc., mas, características genéticas como a homologia de ácido desoxiribonucleico, características sorológicas e princípios de taxonomia numérica, também são muito importantes (D'AOUST et al., 2001). Segundo POPOFF et al. (2001), o gênero compõe-se apenas de duas espécies, *S. Enterica* e *S. Bongori*, sendo que a espécie *S. Enterica* tem seis subespécies.

Salmonela pode causar infecções entéricas, infecções extra-intestinais e infecções sistêmicas. Segundo D'AOUST et al. (2001), a capacidade de causar infecção dentre muitos fatores depende:

a) da capacidade de aderir, colonizar e invadir as células do epitélio intestinal e células M das placas de Peyer do hospedeiro. A colonização é mediada pela interação de fimbrias tipo 1 ou tipo 3, adesinas de superfície (proteínas), hemaglutininas com polipeptídios localizados nas microvilosidades da superfície intestinal;

b) da capacidade de produzir toxinas, como citotoxina e enterotoxina. A citotoxina é uma proteína termolábil que inibe a síntese proteica e causa lise da célula hospedeira (KOO et al.1984).

Conforme UZZAU et al. (2000), os sorotipos de salmonela são geralmente agrupados naqueles adaptados ao hospedeiro e naqueles não adaptados ao hospedeiro. Os sorotipos adaptados, como Typhi, Gallinarum e Abortusovis estão geralmente associados com doença sistêmica em humanos, aves e ovinos, respectivamente. Entretanto, também ocorrem casos de doença em mais de uma espécie de hospedeiro, causados por determinado sorotipo de salmonella, como e o caso dos sorotipos Dublin e Choleraesus. Estes sorotipos estão associados a doenças sistêmicas em bovinos e em suínos respectivamente, mas podem eventualmente causar doenças em outros hospedeiros mamíferos, incluindo humanos.

No homem, a salmonelose é uma doença que pode ser causada por ingestão de células de salmonela. Os sintomas desenvolvem-se em 12 a 24 horas após o contato

com o microrganismo e, consistem de náuseas, febres, calafrios e diarreia. A doença dura em média 4 -7 dias e nas diarreias severas recomenda-se, a hospitalização. (JAY, 2000). Em casos de salmoneloses de origem alimentar a dose infectante pode variar em função do sorotipo, em geral são necessárias cerca de $10^7 - 10^9$ células/g de *Salmonella*, mas alimentos contendo até uma célula/g já foram causadores de surtos.

Salmonella Gallinarum, causa uma grave doença sistêmica que afeta aves. De acordo com SHIVAPRASAD (2000), galinhas com tifo apresentam sintomas clínicos em aves jovens e adultas, incluindo anorexia, diarreia, desidratação e fraqueza.

As aves são contaminadas principalmente por via horizontal. O contato entre aves saudáveis e aves doentes, presença de aves mortas, aves selvagens e trabalhadores contribuem para a disseminação de *Salmonella Gallinarum* (BERCHIERI, 2000). Por isso, *Salmonella Gallinarum* afeta parâmetros de produção, resultando na alta mortalidade e perdas econômicas (POMEROY, 1987; BERCHIERI, 2000; SHIVAPRASAD, 2000). Apesar de existirem programas de vacinação contra esta doença têm sido relatados surtos no México, América Central, América do Sul, África, Índia e Coréia do Sul (BERCHIERI, 2000; SHIVAPRASAD, 2000; JI - DONG et al., 2006).

2.6.1. Importância de *Salmonella* sp. para a indústria avícola

Embora a *Salmonella* sp. possa estar presente em todos os tipos de produtos de origem animal e até mesmo em vegetais, os produtos avícolas tem este agente fortemente ligado a sua imagem. Ademais, tornou-se uma importante barreira sanitária nas exportações de carne de frango (SOUSA et al, 2007).

Considerando a importância da produção avícola para a economia do Brasil e os avanços obtidos pelo setor que posicionavam o país em segundo lugar no mercado internacional de carnes de aves, institui-se o Programa Nacional de Sanidade Avícola em setembro de 1994 (BRASIL, 1994). A estrutura dos serviços veterinários públicos e privados permite dar apoio ao setor nas áreas de campo, laboratório e inspeção de produtos de origem animal. Além disso, a atual situação sanitária da avicultura viabiliza

a implantação de estratégias de combate e /ou erradicação dos principais agentes infecciosos de interesse em avicultura e saúde pública, entre os quais as salmonelas.

De acordo com as novas exigências de segurança dos alimentos, o sistema de inspeção é realizado em conjunto com as práticas de garantia de qualidade, baseado nos princípios das BPF (BRASIL, 1997), procedimento padrão de higiene operacional (PPHO) e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) (BRASIL, 1998). Tanto o Ministério da Agricultura, ANVISA e os países exportadores exigem a aplicação destes princípios durante o abate e processamento das aves.

Segundo a ANVISA, os alimentos de origem avícola devem apresentar ausência de *Salmonella sp.* em 25 gramas de produto (BRASIL, 2001).

As taxas de mortalidade entre humanos e animais contaminados por *Salmonella sp.* ainda são elevadas (CDC, 2003). Desta forma, para prevenir *Salmonella sp.* na cadeia alimentar, deve ser efetuado o monitoramento bacteriológico e a rejeição das aves infectadas da produção de alimentos. Adicionalmente, devem ser introduzidas às boas práticas de fabricação, as análises de perigos e pontos críticos de controle na indústria avícola.

BÄUMLER et al (2000) observaram que o aumento nos casos de salmoneloses em humanos ocorridos por volta de 1960 na Inglaterra e EUA coincidiu com o declínio das aves comerciais soropositivas para *Salmonella Pullorum*. Estes fatos sugerem que a eliminação de *S. Pullorum* pode ter favorecido a colonização do trato alimentar das aves por outros sorovares de *Salmonella*.

2.6.2. *Salmonella* Enteritidis em rações avícolas e roedores

Na transmissão horizontal das salmonelas as aves se infectam pela via oral e tem sido grande a especulação de que seu alimento funcione como importante veículo e contaminação. As rações e suas matérias primas, principalmente as de origem animal, apresentam, quase sempre, altas taxas de contaminação por *Salmonella sp.* Entretanto, em praticamente todos os levantamentos realizados, não há a ocorrência dos sorovares adaptados às aves como *Pullorum*, *Gallinarum* e, nem *Enteritidis*

(MIRANDA et al., 1978; SILVA et al., 1973; BERCHIERI et al., 1984, 1989, 1993; HOFER et al. 1997, 1998; ANDREATTI FILHO et al., 2001). Quando esses sorovares aparecem nos isolamentos de rações, acredita-se que estão relacionados a uma falha na identificação da origem do material. Assim, nenhuma ligação convincente tem sido estabelecida entre a infecção de um lote de aves por *Salmonella* Enteritidis e o consumo de ração contaminada. Mesmo assim, as matérias primas de origem animal têm sido retiradas das formulações de rações como forma de controle de SE ou as mesmas têm sofrido processos de peletização e tratamentos químicos. Convém salientar que esses processos reduzem, mas não eliminam a contaminação das rações. Assim, na epidemiologia da SE em granjas, a compra de aves livres tem um papel preponderante e fundamental. Outro aspecto que deve ser salientado é a contaminação ambiental. Aves positivas eliminam SE pelas fezes e estas contaminam o ambiente. As salmonelas podem permanecer por longo período de tempo em um galpão despovoado, embora não apresentem formas de resistência. Ratos de granjas contaminadas podem se tornar portadores de SE e eliminar, também, o agente pelas fezes por longo período de tempo - mais de 10 meses (ECKROADE et al., 1992; HENZLER e OPITZ, 1992). Quanto aos ratos, há uma proposta de que eles seriam os responsáveis pela pandemia de SE (RIEMANN et al., 2000). Esses autores acreditam que a prática de controlar ratos com rodenticidas a base de SE – prática esta extensivamente usada nos EUA em 1895 (ROSENAU, 1910) e banida em 1920 - continuou sendo usada em vários países, inclusive em Cuba, até a década de 90 (FRIEDMAN et al., 1996). Cepas de SE mais virulentas teriam se adaptado aos ratos e esses as introduziram nos ambientes avícolas.

Estudos epidemiológicos mais recentes não têm confirmado esta hipótese (RABSCH et al., 2001). Portanto, limpeza, desinfecção ambiental, vazios sanitários e combate a roedores são partes importantes no controle e erradicação da SE de granjas avícolas.

Segundo PERESI et al (1998), no Estado de São Paulo, a *Salmonella enteritidis* representou 0,4 a 1,0% de todos os sorovares isolados de infecções humanas, até meados da década de 90. Segundo as informações destes autores, verificou-se

aumento crescente no seu isolamento e, em 1995 passou a ser o sorovar predominante, correspondendo a 64,9% dos isolamentos de material de origem humana e 40% de outras origens.

2.6.3. Resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella Enteritidis*

A infecção humana por SE através do consumo de alimentos de origem animal contaminados, particularmente ovos e seus derivados, é um grande problema de saúde pública como já mencionado anteriormente. O problema humano se agrava quando a cepa de SE apresenta resistência às drogas de eleição para o seu tratamento. Há consenso em vários países que o uso indiscriminado de antibiótico na produção animal é uma das causas do aumento da resistência antimicrobiana. O uso de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes no ecossistema de uso. Patógenos humanos e genes de resistência podem passar entre humanos, animais e outros ecossistemas, via contato com animais ou através do consumo de alimento ou água contaminada (KELLEY et al., 1998). Tem sido uma recomendação da Organização Mundial de Saúde o controle e a restrição do uso de antimicrobianos na produção animal (WHO, 2001).

Coincidentemente, houve o desenvolvimento das fluorquinolonas no mesmo período do agravamento dos surtos por SE em animais e no homem. Em vários países as quinolonas foram, e ainda são extensivamente utilizadas no tratamento de lotes de aves infectadas por SE (WHO, 1998). Anteriormente, a medicação tradicional envolvia o uso, via água ou ração, de nitrofurazona, furazolidona, novabiocina e as tetraciclina.

No Brasil, as tetraciclina, penicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, furazolidona, nitrofurazona e avorpacina foram banidas em 1998 como aditivos alimentares em rações animais. Contudo várias drogas seguem sendo permitidas: 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, sulfato de colistina, enramicina, flavomicina, lincomicina, nitrovin, olaquinox, espiramicina, sulfato de tilosina, virginamicina e bacitracina de zinco.

Cepas de SE podem desenvolver resistência pelo uso indiscriminado de drogas no seu país de origem ou através da importação de alimentos contaminados com bactérias carregando genes de resistência ou de pessoas infectadas que retornam de

viagens internacionais. Pesquisadores finlandeses observaram aumento de resistência antimicrobiana em cepas de SE isoladas de viajantes após o retorno de países asiáticos onde as quinolonas são usadas indiscriminadamente. Houve aumento de 3,9% para 23,5% na resistência às fluorquinolonas nas amostras analisadas entre 1995 e 1999 (HAKANEN et al., 2001). Em um estudo, descrito por VARMA et al. (2005), nos Estados Unidos, foi constatado que a resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* não tifoídicas (particularmente *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) estava associada com um aumento na frequência de bacteremias e hospitalização entre os pacientes analisados.

2.6.4. *Salmonella Enteritidis* em alimentos e surtos de infecção alimentar no Brasil

O Codex Alimentarius recomenda a ausência de qualquer sorovar de salmonela em 25 gramas da amostra analisada, incluindo carne de aves e ovos. Os alimentos de origem animal continuam a ser os principais responsáveis pela infecção humana, entre eles a carne de aves, ovos e derivados. Num esforço para conter o aumento de contaminação de produtos avícolas, o governo dos EUA estabeleceu mega - regras para implementação em 4 anos, a partir de janeiro de 1998, pelas quais se aceita a presença de até 20% de carcaças de frango contaminadas. Acima deste o abatedouro pode ser fechado (USDA, 1998). Segundo BARROW (2000), as salmonelas continuam sendo a maior causa de toxinfecção alimentar humana, e devido a sua habilidade de colonizar o trato entérico das galinhas, aumenta o risco de contaminação da carcaça e de ovos.

Na década de 80, houve um aumento expressivo nos casos de toxinfecções alimentares associadas a salmonelas na Europa, América do Norte e do Sul (RODRIGUE et al., 1990), fato que culminou com a intensificação de pesquisas sobre salmoneloses em animais e seres humanos (BARROW, 1993). No Brasil também houve um significativo aumento nos casos de contaminação de humanos, destacando-se a *Salmonella Enteritidis* entre os sorotipos mais isolados (FERNANDES et al., 2003;

TAVECHIO et al., 1996) também em aves (BERCHIERI JUNIOR, 2000; KANASHIRO, 2005). Em análises de alimentos destinados à merenda escolar comprados pela prefeitura do Estado de São Paulo entre 1992 e 1996, 76,4% das amostras positivas para salmonella eram obtidas de frangos. SE correspondeu a 70,6% das amostras isoladas. A porcentagem de SE aumentou para 81, 4% em 1997 segundo LIRIO et al., (1998).

Em 2000, FUZIHARA et al. Encontraram salmonelas em 42% das amostras de carcaças de frangos oriundas de 60 pequenos abatedouros da cidade de Mauá, SP, onde 30% dos sorovares identificados pertenciam ao sorovar SE. Nessa mesma época, OLIVEIRA e SILVA (2000) encontraram, praticamente, 10% das amostras de ovos de galinha obtidos no comércio varejista de Campinas, SP, no período de janeiro a março de 1995, positivos para SE. Embora as carcaças de frangos apresentem altas taxas de contaminação por SE, são os ovos e seus derivados os principais responsáveis pelos surtos humanos. Em praticamente todos os surtos por SE no Brasil com a caracterização da origem, ovos e derivados estavam envolvidos com os mesmos (ARAÚJO et al., 1995; 1998; KAKU et al., 1995). Num extenso estudo de 115 surtos alimentares por SE ocorridos na região de Campinas, SP, que engloba 87 municípios, SIMÕES et al. (2001) mostraram que ovos, seus derivados e pratos contendo os mesmos mal cozidos foram os principais responsáveis pelos surtos, destacando a maionese caseira, com 57% dos casos, seguido pela cobertura de bolos, com 15%. Nesse estudo, 807 pessoas ficaram doentes, com 5 óbitos.

REZENDE (2002), avaliando doze lotes de frangos em três abatedouros do estado de Goiás, identificou que 75% desses foram positivos para *Salmonella* sp, do total de amostras analisadas (excretas, vísceras destinadas a fabricação de farinhas, carcaças, vísceras comestíveis e água de tanque de pré – resfriamento), 9,39% demonstraram o isolamento do agente, sendo identificado seis sorovares. Ressalta - se que *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium foram os de maior frequência com 67,66% e 11,76% de isolamento, respectivamente.

Segundo o relatório da Rede Européia de Vigilância de Salmonela, comentado por BARROW et al., 1999 e NASCIMENTO et al., 2000, a presença de *Salmonella* spp,

no ambiente avícola, rações e nas próprias aves tem implicação direta no controle do patógeno em carcaças processadas e produtos industrializados.

No Brasil, de acordo com os dados reportados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, no período de 1999 a 2004, as bactérias foram responsáveis por cerca de 30% dos surtos de DTA, sendo a grande maioria por *Salmonella*, em especial *S. Enteritidis* (17,4%) (EDUARDO, 2005).

Segundo HENZLER e OPTIZ (1999), o monitoramento dos ingredientes que permitem sobrevivência do agente e imprescindível, não somente os de origem animal, mas os de origem vegetal além da adoção de boas práticas de higienização do ambiente das fábricas, equipamentos e silos; o controle de umidade, pó ou resíduos.

2.7. 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 para consumo humano. As funções de prevenção de doenças e promotores de crescimento são controversas entre pesquisadores, pois se aplica 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 do 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, e 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 claro, de que são usadas drogas análogas às utilizadas terapêuticamente em humanos.

Em uma população de microrganismos, pode haver bactérias que 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; PARENTE; 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 ao ambiente (COLLIGNON et al., 2005).

2.8. Substâncias orgânicas que inibem a multiplicação de microrganismos: EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético e Acido acético

A membrana externa das bactérias Gram-negativas, como *Salmonella*, é uma bicamada de membranas que se forma externamente à parede celular e está unida ao peptidoglicano por uma camada semicontínua de pequenas moléculas lipoprotéicas. Em sua face interna a membrana externa contém glicerofosfolípidos e, em sua face externa, moléculas de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é composto de uma parte lipídica (lipídeo A) e de um heteropolissacarídeo complexo, com caráter parcialmente aniônico. O LPS une-se à superfície hidrofílica da parede celular constituindo-se numa barreira para substâncias hidrofóbicas e macromoléculas (NIKAIDO, 1996).

De acordo com HANCOCK (1997), o lipídeo A insere-se na membrana e em muitos Gram-negativos compõe-se de difosfato de diglucosamina com 5 a 7 ácidos graxos ligados a uma região de 8 a 12 açúcares e 3 a 8 resíduos de fosfato associados com o antígeno "O", que consiste de 3 a 5 unidades repetidas de açúcares. Para bactérias que não possuem este antígeno, o LPS é chamado lipo-oligossacarídeo.

Em resumo, os componentes mais importantes da estrutura da membrana externa de bactérias Gram-negativas são as porinas e o LPS, sendo que este possui cargas negativas e superfície externa poliônica, principalmente neutralizada por cátions divalentes de Mg^{2+} e Ca^{2+} (HANCOCK, 1997).

A presença de quelantes altera a estrutura da membrana externa, pois estes compostos são capazes de seqüestrar íons metálicos divalentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas e formar complexos estáveis. Como conseqüência, ocorre à alteração da permeabilidade (VAARA, 1992), tornando a célula sensível a determinadas substâncias, como bacteriocinas. (HELANDER e MATTILA-SANDHOLM, 2000).

O EDTA é um agente quelante que faz a remoção de íons divalentes a partir de sítios de ligação no lipopolissacarídeo - LPS. Cerca de 30-50% de LPS e outros lipídeos e proteínas são liberados da membrana externa com EDTA (VAARA, 1992). Como conseqüência, fosfolipídeos presentes na face interna da membrana externa ocupam parcialmente a face externa, tornando-a permeável a compostos hidrofóbicos (HELANDER et al., 1997). Com relação ao ácido acético este pode ser empregado como conservante, e também como acidulante, regulador de acidez ou seqüestrante (ANVISA, 1999 a, b,c).

O ácido acético, ácido orgânico de cadeia curta, fraco, conhecido também como etanóico, possui fórmula molecular CH_3COOH , é empregado em alimentos como conservante. LE NY (2005) esclarece que o ácido acético tem sido empregado na água de frangos submetidos à restrição alimentar, no período de 8 horas que antecede ao abate. O principal objetivo é reduzir a carga de salmonelas do inglúvio e conseqüentemente das carcaças.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Caracterizar a atividade inibitória do crescimento de *Salmonella sp* de isolados de *Lactobacillus acidophilus* em associação com substâncias antimicrobianas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade inibitória "in vitro" pela produção de bacteriocinas, de cinco isolados de *Lactobacillus acidophilus*, obtidos de avestruz, e um isolado de laticínio, sobre *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* ser. *Enteritidis* e *Salmonella gallinarum* isoladas de aves.
- Avaliar a cinética de inibição da multiplicação de *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum* sob ação de nisina em combinação com EDTA e ácido acético em diferentes tempos.
- Caracterizar a atividade inibitória de *Lactobacillus acidophilus* C1 "in vivo", avaliando a eficiência do tratamento com nisina + ácido acético e *Salmonella sp.* em pintainhos.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, pertencente ao Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP/FCAVJ, campus de Jaboticabal-SP.

4.1. Ensaio experimental "in vitro"

Foi avaliada a atividade inibitória "in vitro" pela produção de bacteriocinas, de cinco isolados de *Lactobacillus acidophilus*, obtidos de avestruz, e um isolado de laticínio, sobre *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* ser. *Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum* isoladas de aves.

4.1.1. Cepas e condições de crescimento

L. acidophilus (C1, 5A, 8A, 12A e 22A), isolados de avestruzes adultos e pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios – UNESP, campus de Jaboticabal – SP e uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* (SL-199) isolado de um produto lácteo em um laticínio, pertencente à coleção de cepas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) encontravam-se acondicionados à temperatura de -15°C e após o processo de descongelamento à temperatura ambiente foram reativados utilizando-se o Caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com incubação a 37°C durante 24 - 72 horas. Procedeu-se em seguida o isolamento para Ágar MRS e incubação por um período de 24 a 72 horas a 37°C em jarras de anaerobiose com o sistema Gás-Pak.

As cepas de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum* isoladas de aves, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Anaeróbios da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal-SP, encontravam-se estocadas em Agar nutriente, foram inoculadas separadamente em, em 10 mL de caldo de enriquecimento Rappaport – Vassiliadis (RV) e Selenito Cistina (SC) e incubadas por 24 horas a 42°C, para multiplicação do agente. Após este período, 0,03 µl foram transferidos com auxílio de alça níquel cromo, por semeadura em estrias e esgotamento em Agar MacConkey, por 24 horas a 47°C. As colônias de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*, foram ressuspendidas, separadamente, em 1,0 mL de solução salina a 0,85%, pH 7,0. A suspensão concentrada de bactérias, em volume de 1,0 mL, baseou-se na escala de Mac Farland em concentração de 10^7 UFC/mL, para cada sorovar.

4.1.2. Testes de inibição do crescimento de *Salmonella*

Para o teste de inibição foi utilizado o método de dupla camada, segundo Maia et al. (2001). Utilizou-se um inóculo com 10^7 UFC/mL, determinado a partir do grau de turvação comparado com a escala de Mac Farland e confirmado pela semeadura em placas e contagem em UFC/mL, de cada uma das amostras de *L. acidophilus*, preparadas em caldo MRS e incubados a 37°C durante 18 horas. Estes foram distribuídos em cinco pontos equidistantes na superfície de uma placa de Agar MRS e incubados durante 72 horas a 37 °C. Após incubação, as bactérias foram mortas por exposição ao clorofórmio durante 20 minutos. Decorrido esse tempo, foi adicionada uma segunda camada com 3,5 mL de Ágar Infusão Cérebro-Coração (BHI), contendo 0,75% de Ágar – Ágar, BHI semi sólido – e 1% de uma suspensão de cada microrganismo indicador com 10^6 UFC/mL, como: *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum* separadamente. Após isso, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas em aerobiose e então avaliadas para a presença de zonas de inibição de crescimento, em milímetros, a partir do centro do inóculo.

4.1.3. Teste de antagonismo "spot-on-the-lawn"

Utilizou-se da metodologia proposta por LEWUS e MONTVILLE (1991), e modificada por De MARTINIS et al. (2001). Para tanto, foram preparadas placas de Petri contendo ágar Soja Trypticase (TSA) suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura (TSAYE). Foram adicionados 2 µl no centro da cultura supostamente produtora de bacteriocina, em caldo MRS, incubada a 37°C durante 18 a 24 horas. Após incubação, aproximadamente 8 ml de ágar BHI semi-sólido e 1% de uma suspensão com 10^7 UFC/mL de cada organismo indicador, separadamente, foram adicionados às placas de TSA-YE. Na seqüência foram incubadas em aerobiose durante 18 a 24 horas a 37°C. O antagonismo é detectado pela formação de um halo de inibição de crescimento do microrganismo indicador a partir da cultura produtora de bacteriocina.

4.1.4. Exclusão da ação de bacteriófagos líticos

Para avaliação do processo de exclusão da ação de bacteriófagos líticos utilizou-se a técnica descrita por LEWUS et al. (1991). A partir das placas que apresentaram o halo de inibição no teste "spot-on-the-lawn" realizou-se um corte no ágar ao redor do halo, sendo este ágar adicionado a 3 mL de caldo BHI, triturado com um bastão de vidro estéril e mantido à temperatura ambiente durante 60 minutos. Adicionaram - se 100 µl dessa suspensão e 100 µl de cada cultura indicadora a 8 mL de agar BHI semi-sólido, que posteriormente foi distribuído homogeneamente sobre uma placa de agar BHI. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. A observação de zonas de lise é indicativa da presença de bacteriófagos líticos.

4.1.5. Sensibilidade à protease de bacteriocinas produzidas pela cepa de *L. acidophilus*

Para confirmação da natureza protéica das substâncias antagonistas seguiu-se a metodologia descrita por LEWUS et al. (1991), utilizando-se Tripsina como protease. Inicialmente, adicionaram-se 2 µl de caldo MRS previamente inoculado com a cultura produtora de bacteriocina e incubado durante 24 horas a 37°C, em um ponto de placa de ágar TSAYE. Foram então escavados pequenos poços no ágar TSA-YE próximos da cultura produtora inoculada, os quais foram preenchidos com 20 µl da enzima a ser testada (20 mg/mL em água destilada) e paralelamente outro ensaio controle foi realizado adicionando-se apenas água destilada. As placas permaneceram depois em repouso durante 10 minutos, à temperatura ambiente, permitindo a difusão das enzimas no ágar. A seguir, as placas foram recobertas com 8 mL de Agar BHI semi-sólido e 1% de uma suspensão contendo com 10⁶ UFC/mL de cada isolado em estudo. Posteriormente, as placas foram incubadas em aerobiose durante 24 horas a 37°C. A destruição da substância antagonista devido à ação da enzima proteolítica (Tripsina) é comprovada pela ausência do halo inibitório próximo ao ponto da adição da protease. Nos controles, o halo permanece inalterado. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.2. Avaliação da cinética de multiplicação com substâncias antimicrobianas

Para a realização dos testes com *Salmonella Gallinarum* e com *Salmonella Enteritidis* foram realizados os seguintes tratamentos:

Tratamento 01: EDTA + (controle positivo);

Tratamento 02: EDTA + e nisina;

Tratamento 03: EDTA + *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL199

Tratamento 04: EDTA + *Lactobacillus acidophilus* C1

Tratamento 05: *Lactobacillus acidophilus* C1

Tratamento 06: *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL-199

Tratamento 07: Ácido Acético (controle positivo)

Tratamento 08: Ácido Acético + nisina

Tratamento 09: Ácido Acético + *Lactobacillus acidophilus* ITAL

Tratamento 10: Ácido Acético + *Lactobacillus acidophilus* C1

4.2.1. Determinação da ação combinada de *Lactobacillus* com substâncias antimicrobianas sobre o crescimento “in vitro” de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*

Esses ensaios seguiram o modelo adotado por GELINSKI, 2003 e modificado por GARCIA, 2008.

4.2.1.1. Efeito do EDTA em cultivo simples

Para verificar o efeito do EDTA sobre a multiplicação de *Salmonella Enteritidis* e *S. Gallinarum* foram preparados erlenmeyers contendo 100 mL de caldo BHI adicionado de EDTA na concentração de 20 mM. Alíquotas de 1 mL de uma suspensão de *Salmonella Enteritidis* e/ou *Salmonella Gallinarum* com concentrações de 10^7 UFC /mL, foram transferidos em erlenmeyers em duplicata. Os frascos foram incubados a 37°C sob agitação a 140 rpm. Em intervalos regulares de 2 horas, até o limite de 06 horas foram semeados em placas de Petri com Ágar Mac Conkey (OXOID), em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Efetuou-se a contagem das colônias e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em

UFC/mL. Também foram preparados erlenmeyers contendo meio BHI sem EDTA que serviram como controle da multiplicação de *Salmonella*. O experimento foi realizado três vezes.

4.2.1.2. Efeito inibitório sobre *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum* isoladamente ou em combinação com substâncias antimicrobianas de isolados de *Lactobacillus acidophilus* C1 e ITAL SL-199

Foram preparadas culturas de 24 horas em meio BHI de cada uma das cepas de *Salmonella* (*S. Enteritidis* e *S. Gallinarum*) e meio MRS em anaerobiose para *Lactobacillus acidophilus*, até a obtenção de uma concentração aproximada de 10^7 UFC/ml. A cada 02 desses frascos, adicionou-se 1 ml das culturas de *Salmonella* e 1 mL de *Lactobacillus acidophilus* C1 e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL-199, separadamente. Frascos contendo as culturas individuais de cada microrganismo em meio BHI, também foram preparados e serviram como controle. Todos os frascos foram incubados a 37°C em anaerobiose sob agitação a 140 rpm. Em intervalos regulares de 2 horas, até o limite de 06 horas foram retiradas alíquotas do meio de cultura de cada frasco e semeados em placa de Petri com agar MC para *Salmonella* e MRS para *Lactobacillus*, em duplicata. As placas foram incubadas a 24-48 horas a 37°C para *Salmonella* e 24 – 48 horas a 42°C em anaerobiose para *Lactobacillus*. Efetuou-se a contagem nessas placas das colônias características e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em UFC/mL. O experimento foi realizado três vezes.

4.2.1.3. Efeito de EDTA sobre *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum* na presença de bacteriocina comercial (nisina)

Foram preparadas culturas de 24 horas em meio BHI de cada uma das culturas de *Salmonella* até a obtenção de uma concentração aproximada de 10^7 UFC/ml. Alíquotas de 1 ml da cultura de *Salmonella* foram transferidas para frascos erlenmeyers contendo 100ml de caldo BHI contendo EDTA (20mM) e nisina (500 UI/mL). Frascos

contendo apenas meio BHI (sem EDTA) e cepas de *Salmonella* também foram preparadas e serviram como controles. Os frascos foram incubados a 37° C em aerobiose sob agitação a 140 rpm. Em intervalos regulares de 2 horas até o limite de 06 horas, foram retiradas alíquotas do meio de cultura de cada frasco e semeados em placa de Petri com ágar Mac Conkey para *Salmonella*, em duplicata. As placas foram incubadas a 24-48h a 37°C. Efetuou-se a contagem nessas placas e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em UFC/mL. O experimento foi realizado três vezes. Todas as contagens foram realizadas com auxílio de um contador de colônias (PELCZAR et al., 1996).

4.3. Determinação do efeito do ácido acético

Seguiram-se os mesmos procedimentos descritos nos itens; 4.2.1.1., 4.2.1.2., e 4.2.1.3, ampliando-se os testes de forma a substituir o EDTA por ácido acético a 2,0%.

4.4. Ensaio experimental “in vivo”

Após análise prévia dos resultados do experimento “in vitro”, realizou-se a segunda fase deste trabalho constituindo o experimento “in vivo”. Baseando-se com isso nos melhores resultados de inibição, contra os agentes patogênicos em foco.

4.4.1. Local e período experimental

O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP – Jaboticabal, durante o período de 15 de agosto a 21 de setembro de 2008, totalizando 45 dias.

4.4.2. Aves

Foram utilizados 240 pintainhos da linhagem comercial “Cobb”.

4.4.3. Manejo das aves e condição de criação

O manejo adotado durante a condução do experimento foi o usualmente empregado na criação comercial de frangos de corte. As aves foram alojadas em isoladores com controle de temperatura, luminosidade e ventilação e vacinadas contra

a doença de Marek no incubatório, aos sete dias contra a doença de Newcastle e, novamente aos 18 dias de idade contra a doença de Gumboro.

As aves receberam ração sem farinha de carne e confirmadas como isenta de *Salmonella*, além de não conter nenhum tipo de aditivo ou coccidiostático e água *ad libitum* por todo o período de criação. As mesmas foram alojadas em cama de maravalha previamente esterilizada. Para a retirada de cada uma das rações e manejo, foram utilizadas conchas específicas, tomando-se o devido cuidado para que os microrganismos de um tratamento não contaminassem os outros, sendo o mesmo procedimento adotado com o material de limpeza, onde existiam buchas específicas para a lavagem dos bebedouros de acordo com cada tratamento. Também foram utilizados sacos plásticos nos calçados, um para cada tipo de tratamento, no intuito de não haver contaminação microbiana ao passar de um manejo de um tratamento para o outro.

4.4.4. Preparo das culturas de *S. Enteritidis* e *L. acidophilus* C1

Para as culturas de *Salmonella Enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* C1, o procedimento utilizado foi descrito anteriormente no item 4.1.1.

4.4.5. Delineamento experimental e tratamentos

As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4X3, totalizando 4 tratamentos com 3 repetições de 20 aves.

Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

Tratamento 1: (T1) os pintos foram alimentados com ração e água convencional e desafiadas com *Salmonella Enteritidis*, (grupo controle positivo);

Tratamento 2: (T2) os pintos foram alimentados com água e ração convencional sem adição de antibiótico e promotor de crescimento e não foram desafiadas com *Salmonella Enteritidis*. (grupo controle negativo);

Tratamento 3: (T3) os pintos receberam o tratamento com *Lactobacillus acidophilus* C1 e desafiados com *S. Enteritidis*;

Tratamento 4: (T4) os pintos receberam tratamento com nisina (500 UI/mL), ácido acético (2,0%) e foram desafiados com *S. Enteritidis*.

4.4.6. Administração das cepas utilizadas e teste de desafio

As aves do grupo 3 (T3), foram inoculadas via endoesofágica, com auxílio de sonda e seringa graduada de 1 mL com *Lactobacillus acidophilus* C1 (1 mL da cultura contendo 10^7 UFC/mL) no primeiro dia de idade. O desafio foi realizado 24 horas após o tratamento administrando 1 ml de uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *Salmonella Enteritidis*.

As aves do grupo 4 (T4), receberam ácido acético (2,0 %) na água de bebida 24 horas antes da aplicação da nisina. As aves foram tratadas com nisina (500 UI/mL) via oral com auxílio de uma cânula esôfágica, no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia de idade. Os desafios foram realizados administrando 1 ml de uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *S. Enteritidis* após 24 horas de cada tratamento com nisina.

4.4.7. Controle bacteriológico das aves

Além das aves utilizadas durante o experimento, outras 10 aves do mesmo lote foram examinadas quanto à presença de *Salmonella*. Estas aves foram sacrificadas e colheu-se o fígado das mesmas, armazenando-os em gral. Após colheita, cada pool de amostra foi macerado e posteriormente, inoculado em caldo Selenito com novobiocina na proporção de 1: 10. O mesmo procedimento foi realizado para amostras de baço, gema e conteúdo cecal. Os caldos inoculados com as amostras de órgãos foram incubados a 37°/24 horas, sendo semeados em ágar verde brilhante e ágar Mac Conkey, seguiu-se a incubação a 37°C por 24 horas.

4.4.8. Colheita de amostras

4.4.8.1. Suabes cloacais

Após a inoculação de *Salmonella enteritidis*, nos intervalos de 7, 14 e 21 dias, foi realizada a coleta, usando-se suabe de algodão estéril e transportadas imediatamente

ao Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia FCAV/UNESP onde as amostras foram processadas.

4.5. Procedimento microbiológico

4.5.1. Pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* (APHA, 2001)

Os suabes cloacais foram transportados imediatamente após a coleta, embebidos em água peptonada tamponada a 0,1%. Após homogeneização, permaneceu em repouso por 6 horas em temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se a incubação a 37°C por 18 horas, após, foi realizado o enriquecimento.

4.5.1.1. Enriquecimento seletivo

Nesta fase, duas alíquotas de 1 mL cada, da cultura de pré-enriquecimento, foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo selenito cistina e em 10 mL de caldo Rappaport-vassiliadis, adicionados de 0,1 mL de uma solução de novobiocina a 0,4%, obtendo uma concentração de 40 microgramas do princípio ativo por mililitro do meio. Em seguida, os caldos seletivos foram incubados a 37°C por 24 horas.

4.5.1.2. Plaqueamento seletivo

Com auxílio de alça níquel-cromo, cada cultura em caldo de enriquecimento foi semeada pela técnica de esgotamento, em Agar verde – brilhante e Agar Mac Conkey, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

4.5.1.3. Identificação presuntiva

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas, com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, previamente flambada, de cada uma das placas semeadas, 3 a 5 colônias com características sugestivas de *Salmonella* e inoculadas em tubos contendo meio (TSI).

4.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de SHAPIRO WILK e LEVENE ambos a 5% de probabilidade, para verificação da normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias (SAS, 1999). Apenas os dados de crescimento de *Salmonella Gallinarum*, referentes ao primeiro experimento, foram transformados em \sqrt{x} , para satisfazer as hipóteses estatísticas. As análises de variâncias seguiram o delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas.

O fator principal foi constituído por diferentes substâncias antimicrobianas, sendo o fator secundário constituído pelos tempos de determinação do crescimento de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Enteritidis*. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Em função dos tempos, foram realizadas análises de regressão polinomial, adotando-se, como critérios de seleção dos modelos, o maior R^2 e a significância de 5% dos parâmetros das equações.

V. Resultados e Discussão

5.1. Avaliação da ação antimicrobiana “in vitro”

A análise dos resultados sobre a capacidade inibitória "in vitro" dos isolados de *L. acidophilus* frente a *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum* podem ser visualizados na Tabela 3. De acordo com o diâmetro dos halos de inibição em ágar MRS, observam-se variações entre 0 a 15 mm, sendo classificadas como fracas inibições, para as cepas 5A e 12A frente a *S. Gallinarum* e 22A frente à *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum* apresentando halos de 0 a 4 mm. Os halos de inibição classificados como médios foram para os isolados 8A e SL-199 contra *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*, excetuando-se para a cepa C1 frente a *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum* em que foi caracterizado forte efeito inibitório, com halos de 10 a 15mm. Para os isolados 5A e 12A contra *Samonella Enteritidis* não foram observadas zonas de inibição.

Na análise de produção de bacteriocinas, foi verificado que apenas o isolado C1 apresenta produção de bacteriocina, enquanto que os demais modelos não são e

devem exercer sua ação anti-bacteriana através da produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, como demonstrado na Tabela 4.

A capacidade de síntese de bacteriocina pelo isolado C1 foi confirmada pelo teste de sensibilidade enzimática da bacteriocina, que demonstrou ser sensível à tripsina, permitindo o crescimento das culturas indicadoras.

Tabela 3 - Zonas de inibição¹ no teste de dupla camada apresentadas pelos isolados de *L.acidophilus* (C1, 5A, 8A, 12A e 22A), e *L. acidophilus* SL-199 contra *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*

Cepas antagonistas	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>
<i>L.acidophilus</i> C1	15,0 (+++)	10,0 (+++)
<i>L.acidophilus</i> 5A	0,0 (-)	3,0 (+)
<i>L.acidophilus</i> 8A	8,0 (++)	6,0 (++)
<i>L.acidophilus</i> 12A	0,0 (-)	2,0 (+)
<i>L.acidophilus</i> 22A	4,0 (+)	4,0 (+)
<i>L.acidophilus</i> SL-199	9,0 (++)	7,0 (++)

1. Medidas desde o centro do inóculo até a borda da zona de inibição (em milímetros). Halos de inibição: (-) negativo; (+) fraca inibição (halos até 4 mm); (++) média inibição (halos de 5 a 9 mm); (+++) forte inibição (halos de 10 a 15 mm).

Tabela 4 - Resultados do teste* "spot on the lawn" pelos isolados de *L. acidophilus* (C1, 5A, 8A, 12A e 22A e SL-199) contra *S. enteritidis* e *S.gallinarum*

Cepas antagonistas	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>
<i>L.acidophilus</i> C1	+	+
<i>L.acidophilus</i> 5A	-	-
<i>L.acidophilus</i> 8A	-	-
<i>L.acidophilus</i> 12A	-	-
<i>L.acidophilus</i> 22A	-	-
<i>L.acidophilus</i> SL-199	-	-

*(-) = sem inibição; (+) = com inibição

No presente estudo, demonstrou-se que *Lactobacillus acidophilus* C1 foi capaz de produzir bacteriocina com atividade contra *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*, tais resultados foram semelhantes aos obtidos CHIODA et al, (2006) em estudos realizados com o mesmo isolado sendo demonstrada capacidade inibitória dessa bactéria (isolado) contra *Listeria monocytogenes* com halos de inibição variando de 15 a 14mm de diâmetro em testes de inibição contra *E.coli* BIA 46 (STEC), utilizando como cepa probiótica o *Lactobacillus acidophilus* P1, com halos de inibição de 15mm de diâmetro (CHIODA, et al., 2007). De acordo com LEWUS et al. (1991), a atividade inibitória pode ser detectada no teste "spot-on-the-lawn" capaz de excluir a inibição por ácidos orgânicos e por peróxido de hidrogênio, utilizando-se um meio de cultura isento de glicose ou outro açúcar fermentável (TSAYE). Os resultados do presente trabalho demonstram que dos cinco isolados de *L. acidophilus* com capacidade inibitória em meio MRS, foi reduzido a uma cepa, quando em meio TSAYE.

Estudos semelhantes foram realizados por BUSARCEVIC et al., (2008) em que *Lactobacillus salivarius* BGH01 de isolados orais humanos apresentaram produção de bacteriocina denominada LS1 e atividade antagonista no crescimento "in vitro" de *Streptococcus mutans*, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus flavus*, e *Salmonella Enteritidis* .

Os isolados de *L. acidophilus* que não apresentaram capacidade de inibição em meio TSAYE foram caracterizados como produtores de ácidos ou peróxido de hidrogênio. JUVEN et al., 1992, demonstraram a capacidade de um isolado de *Lactobacillus acidophilus* para a produção de ácido láctico e de peróxido de hidrogênio. Estes metabólitos têm mostrado amplo efeito inibitório contra *E. coli*, *Salmonella sp*, *Clostridium sp* e *Helicobacter sp*. (SAARELA et al., 2000). Em relação á característica da sensibilidade à tripsina, MONTVILLE & KAISER (1993), afirmaram que a inativação da atividade de uma bacteriocina por uma ou mais proteases é prova suficiente de que o inibidor microbiano é protéico sendo, portanto uma bacteriocina.

5.2. Avaliação da multiplicação de *S. Gallinarum* com os reagentes EDTA e ácido acético

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, verifica-se que a associação de EDTA no tratamento (T1) e do probiótico no tratamento (T6) não diferiram entre si nos tempos de 2, 4 e 6 horas.

Também foi observado que, para os tratamentos T5 e T8, os resultados não diferem entre si (Tabela 5), para o tratamento T5, com adição de *Lactobacillus acidophilus* C1, que é uma cepa produtora de bacteriocina, houve um aumento da multiplicação de salmonela com 4 horas de incubação e consequente redução com 6 horas de incubação. Para o tratamento T8, a combinação de nisina com ácido acético mostrou-se mais eficiente, demonstrada pelo decréscimo da multiplicação de *S. gallinarum* em todos os tempos, porém não a sua eliminação.

Para os tratamentos T2, T3, T4, T7, T9 e T10 foram apresentadas as menores médias de multiplicação ao longo das 2 horas de incubação, logo, estes resultados não diferem entre si (Tabela 5). Em relação a combinação de EDTA + nisina, referente ao tratamento T2, observou-se um decréscimo da multiplicação ao longo das 6 horas de incubação, efeitos diferentes foram observados para os tratamentos T3, T4 e T10, em que nas primeiras 4 horas de cultivo, a população de *S. Gallinarum* baixou, mas recuperou-se após 6 horas de incubação. Todavia, mesmo com recuperação, ainda ficou abaixo do grupo controle (tratamento 1).

Verificou-se que a ação combinada de ácido acético + *Lactobacillus acidophilus* ITAL (T9), e ácido acético isoladamente (T7), tiveram um aumento da multiplicação de *Salmonella* ao longo de quatro horas de incubação, contudo, foi observado inibição do crescimento de *Salmonella Gallinarum* com seis horas de incubação, como demonstrado na Tabela 5.

De acordo com os resultados encontrados, pode-se verificar que a nisina quando associada ao EDTA (tratamento 2) e ao ácido acético (tratamento 8), a inibição de *Salmonella gallinarum* foi significativa. As avaliações do presente experimento tiveram como referencia os parâmetros do estudo desenvolvido por STEVENS et al., (1991),

que implicam no uso de EDTA como um agente facilitador em combinação ou não com agentes antimicrobianos.

BOZIARIS e ADAMS (1999) realizaram um estudo em caldo fermentado por *Lactococcus lactis subsp. Lactis* produtor de nisina, adicionado de EDTA de 10 mM ou ácido cítrico 20 mM, mais um pool de patógenos constituídos por linhagens de *Escherichia coli*, *S. enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que o EDTA foi mais eficaz na inibição dos patógenos que o ácido cítrico. Os autores também observaram que as cepas de *Salmonella* apresentaram maior sensibilidade que as de *E. coli*, provavelmente em função da baixa tolerância à produção de ácido do que pela ação da bacteriocina na presença de EDTA.

Verificou-se no presente estudo que a ação combinada de antimicrobianos como nisina, EDTA e ácido acético reduziram as contagens de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Enteritidis* ao longo das 6 horas de incubação. STEVENS et al., (1991), observaram que o uso de nisina na concentração de 50 µg/mL em combinação com EDTA (20mM) foi capaz de reduzir de 3 a 6 ciclos logarítmicos as populações de diferentes sorotipos de *Salmonella*.

Este e outros estudos realizados por CUTTER e SIRAGUSA (1999), indicam que não existe ainda uma concentração padrão de uso para nisina quando se visa ação em patógenos Gram positivos ou Gram negativos, havendo grande variação das concentrações usadas variando de 50 U.I./mL a 2.500 U.I./mL. Essas variações devem-se no sistema de estudo, nos mais tipos de tratamentos empregados, no microrganismo alvo. Assim por exemplo, MAHADEO e TATINI (1994), utilizaram nisina na concentração de 100 UI/mL, obtendo uma redução de mais de 4 ciclos logarítmicos na suspensão de *L. monocytogenes*, enquanto o mesmo tratamento aplicado às células aderidas à superfície da pele de peru causou uma redução de apenas um ciclo logarítmico. CUTTER e SIRAGUSA (1999), demonstraram que tratamentos com 50 UI/mL de nisina pura, ou em combinação com 50 mM de EDTA, tiveram pouco efeito sobre *S. typhimurium* ou *E. coli* (menos de 5 ciclos logarítmicos). Em virtude disso, no presente estudo optou-se pela concentração de 500UI/mL de nisina para efeito de comparação desta bacteriocina em relação aos demais tratamentos.

Segundo HELANDER e SANDHOLM (2000), o EDTA é um agente quelante mais efetivo que, adicionado juntamente com a nisina, auxilia na inibição de bactérias do grupo Gram negativas, porém, GILL e HOLLEY (2003), observaram a ineficiência da atuação sobre estas bactérias quando estudaram a possibilidade de sinergismo misturando EDTA e nisina. Eles relataram que o experimento foi conduzido em caldo de nutriente, sem limitações para os microrganismos, condição essa que não ocorre um aumento. Quando esses autores avaliaram a ação de uma linhagem de bactérias Gram-positivas foi observado efeito sinérgico. Estes relatos são respaldados pelos resultados do presente estudo, que evidenciaram que a ação da substância coadjuvante: EDTA foi capaz de inibir em parte a multiplicação das bactérias patogênicas supracitadas.

Tabela 5. Valores médios da multiplicação de *Salmonella Gallinarum* nos diferentes tratamentos* (T1 a T10) nos tempos de 2, 4 e 6 horas de incubação a 37° em caldo BHI.

Tempo	Tratamentos ¹									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
2	18,04 a ²	3,69 c	7,67 c	2,73 c	13,21 b	20,31 a	3,09 c	13,39 b	3,44 c	2,48 c
4	21,11 a	2,64 d	5,09 d	2,05 d	15,51 b	23,12 a	11,61 c	10,47 c	11,19 c	2,95 d
6	18,94 a	1,55 d	8,67 c	2,26 d	13,64 b	18,65 a	10,40 c	7,53 c	4,69 d	7,86 c

*Tratamentos: Tratamento 01: EDTA + *Salmonella gallinarum* isoladamente (controle positivo); Tratamento 02: EDTA + *Salmonella gallinarum* e nisina (500 U.I./mL); Tratamento 03: EDTA + *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL199; Tratamento 04: EDTA + *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* C1; Tratamento 05: *Salmonella gallinarum* + *Lactobacillus acidophilus* C1; Tratamento 06: *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL-199; Tratamento 07: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* isoladamente (controle positivo); Tratamento 08: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* e nisina (500 U.I./mL); Tratamento 09: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL; Tratamento 10: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* + *Lactobacillus acidophilus* C1. ¹ Dados transformados em \sqrt{x} . ² Médias seguidas pela mesma letra na linha na diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

5.3. Avaliação da multiplicação de *S. Enteritidis* com os reagentes : EDTA e ácido acético

Entre os tratamentos estudados que apresentaram inibição completa do crescimento de *Salmonella Enteritidis* ao longo das 6 horas de incubação foram T8 e

T10 (Tabela 6) em que tiveram a adição de *L. acidophilus* produtor de bacteriocina C1 e o tratamento T10, com adição de nisina, ambos adicionados de ácido acético. Apesar de estes tratamentos diferirem entre si com 2 horas de incubação, ambos não diferiram com 4 horas de incubação.

Os ensaios T1 (com aplicação de EDTA) e T6 (com inoculação de *Lactobacillus acidophilus* SI-199), tiveram um aumento da multiplicação de *S. Enteritidis* ao longo das 6 horas de incubação, constatando não ser efetivo na eliminação do patógeno durante o período de incubação, assim parece ilícito dizer que o patógeno pode estar desenvolvendo uma contaminação desejável.

Observando os resultados do tratamento T3, nota-se que a *Salmonella Enteritidis*, aumentou sua multiplicação com 4 horas de incubação, mas teve, no entanto um decréscimo de multiplicação nas 6 horas de incubação .

Observando-se os tratamentos T2,T3,T4,T7, T8 e T9, constatou-se que todos acarretaram numa redução do número de células viáveis do patógeno. Nos tratamentos (T2 e T4) em que o EDTA (20 mM) foi aplicado respectivamente com a adição de nisina (500UI) e *Lactobacillus acidophilus* C1, verifica-se que houve redução de multiplicação do patógeno, comparado com a adição de ácido acético representado nos tratamentos T7 e T10 (Tabela 6).

É possível dizer que, a cepa produtora de bacteriocina (C1), em combinação com EDTA ou ácido acético, confirmou seu potencial de redução da multiplicação de *Salmonella Enteritidis*. Esta constatação, está em consonância com os resultados do presente ensaio, principalmente se forem considerados os relatos de DIBNER e BUTTIN, 2002) no tocante a eficácia bactericida dos ácidos orgânicos é um fator relativo ao local de ação , ao pH do ambiente em que se encontram, à heterogeneidade bacteriana do ambiente avaliado. Verifica - se ainda que o ácido acético possa ser considerado eficiente na eliminação de *Salmonella Enteritidis* na redução do número de células viáveis de *Salmonella Gallinarum*. Para CLEVELAND et al. (2001), foi relatada em sua pesquisa a efetividade da nisina foi maior na ação inibitória sobre bactérias Gram-negativas quando combinada com ácido láctico. Devendo-se ainda considerar que o ácido acético pode ser capaz de determinar diferentes graus de injúria celular subletal

em cepas de *Salmonella Enteritidis* e atuar, assim na redução de células viáveis desse microrganismo (ALEXANDROU et al., 1995).

PALENZUELA, (2002), relatou que a maioria das bactérias crescem mal em pH inferior a 5,0, porém esta condição não garante a esterilidade microbiológica, pois muitos gêneros podem sobreviver nestas condições durante longos períodos de tempo. Segundo o autor, o fator preponderante na atividade inibitória seria devido ao fato de que o pH extracelular distante de 7,0 perturba o gradiente de prótons, que é o principal componente da força próton-motriz, necessária aos processos de transporte através da membrana, motilidade e síntese de ATP acoplada ao processo respiratório.

Tabela 6 - Valores médios referentes à multiplicação de *Salmonella Enteritidis* nos diferentes tratamentos* (T1 a T10) nos tempos 2, 4 e 6 horas de incubação a 37° C.

Tempo	Tratamentos									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
2	401,33 b ¹	24,33 c	74,00 c	346,66 b	142,33 c	231,33 c	503,33 a	307,33 b	418,00 b	602,67 a
4	430,67 a	10,33 c	208,33 c	67,66 c	183,00 b	396,33 a	293,33 b	23,33 c	242,66 b	0,00 c
6	479,00 a	9,00 b	50,33 b	68,66 b	65,33 b	523,00 a	330,00 a	0,00 b	166,66 b	0,00 b

¹Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Tratamento 01: EDTA + *Salmonella enteritidis* isoladamente (controle positivo); Tratamento 02: EDTA + *Salmonella enteritidis* e nisina (500 U.I./mL); Tratamento 03: EDTA + *Salmonella enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL199; Tratamento 04: EDTA + *Salmonella enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* C1; Tratamento 05: *Salmonella enteritidis* + *Lactobacillus acidophilus* C1; Tratamento 06: *Salmonella enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL-199; Tratamento 07: Ácido Acético + *Salmonella enteritidis* isoladamente (controle positivo); Tratamento 08: Ácido Acético + *Salmonella enteritidis* e nisina (500 U.I./mL); Tratamento 09: Ácido Acético + *Salmonella enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL ; Tratamento 10: Ácido Acético + *Salmonella enteritidis* + *Lactobacillus acidophilus* C1.

5.4. Ação “in vivo”

O controle bacteriológico das aves utilizadas no experimento, não inoculadas e que foram sacrificadas no momento da chegada não revelou a presença de *Salmonella* sp.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa, para os tratamentos T1, T2 e T3 ocorrendo interação entre os mesmos ($p < 0,001$), como observado na Tabela 3 do anexo C.

Os resultados referentes aos suabes cloacais (Tabela 7) indicam a infecção cecal das aves desafiadas. Nota-se que os tratamentos T1 e T3 foram positivas para o agente, em virtude deste resultado pode-se inferir que ocorreu excreção de *Salmonella* sp. No tratamento 2, não foram encontradas cepas de *Salmonella* no conteúdo cecal. A propósito, CORRIER et al.,(2001), concluíram que a contaminação por *Salmonella* no papo de frangos de corte aumenta significativamente durante o jejum de 8 horas, e sugerem que a contaminação do trato intestinal de frangos tem relação clínica 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 gastrointestinal do frango e vice versa.

No que tange ao tratamento 3, a inoculação via esofágica de probiótico (*Lactobacillus acidophilus* C1), foi a indicação de que essa bactéria promove a colonização e multiplicação destas bactérias, no trato intestinal das aves contra a colonização por patógeno, como *Salmonella* sp (SCHNEITZ, 1992). O trato gastrointestinal é pouco desenvolvido nos primeiros dias de vida dos pintinhos. Quando as aves são alimentadas ou tratadas incorretamente na fase inicial, maiores problemas podem aparecer na fase seguinte. O grande interesse em controlar *Salmonella* e outro patógenos, se deve a que eles têm uma interferência na redução da digestibilidade e de absorção de nutrientes da ração, contribuindo com a síndrome de passagem rápida, com o aumento de excreção de fezes, em muitos casos fluídas, que levam a uma perda de carboidratos hidrossolúveis, vitaminas e aminoácidos. Com isso provoca a morte dos tecidos intestinais que acabam enriquecendo o conteúdo intestinal e se tornando meio de cultura para o crescimento bacteriano, principalmente *Salmonella* (MACARI, et al., 2002).

A presença de *Salmonella* sp, nas fezes foi acentuadamente reduzida no grupo tratado com *Lactobacillus acidophilus* C1 (produtor de bacteriocina), concordando com os resultados de ANDREATTI-FILHO et al., (1997) em que a presença de *Salmonella*

Enteritidis foi acentuadamente reduzida nos grupos tratados com *Lactobacillus paracasei*. Com isso podemos constatar que o uso de probióticos inibe ou reduz o desenvolvimento de *Salmonella*, no trato intestinal das aves. Esta medida não é ideal, já que não evita a doença nas aves e, também, não garante a produção de alimentos integralmente livres de salmonela. Porém, pode tornar-se uma importante ferramenta para redução da contaminação no abate dos lotes de frangos positivos para enfermidade. Conforme SINNEL, (1995), a flora cecal compete com patógenos, reduzindo infecções causadas por *Salmonella* spp, nos cecos das aves.

PASCUAL et al. (1999) constataram que probióticos à base de *Lactobacillus* sp. inibiram a infecção por *S. enteritidis* em frangos de corte. Trabalho realizado por CARLI et al. (2006) demonstrou que o *Lactobacillus paracasei* possui uma atividade inibitória em relação à *S. enteritidis*, principalmente quando aplicado na água de bebida.

Tabela 7. Detecção de *Salmonella* sp por suabe cloacal em aves, nos tratamentos* T1, T2 e T3.

Tempo	Tratamentos ¹		
	T1	T2	T3
1	2,53 a ²	0,00 c	1,77 b
2	2,30 a	0,00 c	1,07 b
3	1,56 a	0,00 c	0,73 b

¹Dados transformados em Log x+1. ² Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Tratamentos* T1: controle positivo; T2: controle negativo; T3*: *Lactobacillus acidophilus* e *S. Enteritidis*;

Em relação à atividade da nisina com ácido acético no controle de *Salmonella* sp, no teste “in vivo”, observa-se que na Tabela 7, ocorreu diminuição da colonização cecal na primeira aplicação (aos sete dias de idade) e que os resultados não foram satisfatórios ao longo dos demais tratamentos na eliminação ou redução de *Salmonella* sp. Este fato provavelmente pode ser explicado que tenha ocorrido este percentual de reisolamento pela pouca eficiência do ácido e da nisina, para redução ou eliminação de salmonelas e também pela sua menor eficiência á medida que o processo de produção

afastou-se do dia de tratamento. Com isso, tem – se por base as descrições de PENZ-JUNIOR et al, (1993), quando apontaram resultados de pesquisadores sobre o maior percentual de re-isolamento de salmonelas para ácido que não tenha apresentado completa redução do agente. Assemelham-se também as constatações de RICKE, (2003), quando destacou a sobrevivência de *Salmonella Thyphimurium* em ambiente de anaerobiose e em prolongado período de exposição a pH 3,0. Este autor observou que o sorovar é estimulado a aderir e invadir células quando exposto ao ácido acético, sendo o nível de resposta dependente da fase de crescimento da bactéria, concentração e pH. Estes resultados também são respaldados por KNOW e RICKE (1998), onde verificaram que *Salmonella* sp. apresenta esta característica frente aos ácidos orgânicos, tanto no trato gastrointestinal das aves como em rações tratadas e que estes ácidos podem contribuir para o aumento da virulência do patógeno.

Deste modo é oportuno considerar que a incorporação de ácido deve ser constante, pois o aumento na freqüência de isolamento de *Salmonella* sp. ocorre com o passar do tempo reforçando as descrições de PENZ – JUNIOR et al., (1993).

Devido às limitações do espectro de atuação das bacteriocinas tem sido estudado seu efeito sinérgico combinando bacteriocinas que atuam de forma diferenciada (GILL e HOLLEY, 2003) e outros agentes antimicrobianos, sejam aditivos ou em tratamentos (tecnologia de barreiras), (DUFOUR et al., 2003).

MORENO et al., (2000), relata que a maioria das bacteriocinas tem melhor estabilidade de sua atividade em pH ácido a neutro, sendo praticamente inativadas em pH 8,0, a exemplo da nisina. LIU e HANSEN (1990), relatam que a inativação da nisina em meio alcalino pode ser consequência de desnaturação, modificação química ou uma combinação de ambos. CLEVELAND et al., (2001), relataram a efetividade da nisina sobre bactérias gram-negativas quando combinada com ácido láctico.

VI. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, as seguintes conclusões podem ser descritas:

- A habilidade de produzir compostos antimicrobianos foi demonstrada de modo geral pelas cepas de *Lactobacillus acidophilus* C1, 5A, 8A, 12A e 22A e por *Lactobacillus acidophilus* SL-199;
- A cultura de *Lactobacillus acidophilus* C1, demonstrou ser produtora de bacteriocina capaz de inibir *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Gallinarum*;
- A associação de nisina com EDTA e de nisina com Ácido acético, não inibiu a multiplicação de *S. Gallinarum*, mas tornou reduzida ao longo do período de incubação;
- A combinação de Ácido Acético + *Salmonella Enteritidis* + nisina e Ácido Acético + *Salmonella Enteritidis* + *Lactobacillus acidophilus* C1, frente a *S. Enteritidis* foi mais eficiente, inibindo a multiplicação do patógeno;
- A associação do antimicrobiano Ácido acético com o isolado C1 de *Lactobacillus acidophilus* foi mais eficiente em ambos os tratamentos na redução da multiplicação de *Salmonella Enteritidis*.
- O uso do isolado (*Lactobacillus acidophilus* C1) nas aves causou uma redução, na eliminação de excreção de *Salmonella Enteritidis*, quando comparado ao controle;

- A combinação de bacteriocina comercial (Nisina) e ácido acético demonstrou ser ineficaz na multiplicação de *Salmonella Enteritidis*, nos testes realizados “in vivo”.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDROU, O.; BLACKBURN, C.W.; ADAMS, M.R. Capacitance measurement to assess acid - induced injury to *Salmonella enteritidis* PT4. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 27-36, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington , 2001.676p.

ANDREATTI FILHO, R.L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994-1999. **Revista de Educação Continuada**, São Paulo, n. 4, p. 90-101, 2001.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella thyphimurium* e *Salmonella enteritidis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.661-672, 1997.

ANVISA-AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA-1999 a. Res.nº 382 de 5 de agosto de 1999, que aprova o “Regulamento técnico sobre aditivos estabelecendo suas funções e seu limites máximos para a categoria de alimentos , molhos e condimentos”. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Documento extraído em 27 /10/2008.

ANVISA-AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA-1999 b. Res nº 386 de 5 de agosto de 1999, que aprova o “Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções”. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Documento extraído em 27 /10/2008.

ANVISA-AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA-1999 c.Grupo de Trabalho de Aditivos. Disponível em <http://www.anvsa.gov.br/alimentos/Documento> extraído em 27/10/2008.

ARAUJO, E.; PACHECO, M. A. S.R.; BONI, R.F.; FONSECA, Y.S.K.; GELLI, D.S.; FERNANDES, S.A. ; TAVECHIO, A. T. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* associados ao consumo de alimentos à base de ovos em Sorocaba, SP. **Higiene Alimentar**, 9, 24-26, 1995.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEM, S., VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, p.1-63, 1993.

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

BARROW, P.A. Salmonella control-past, present and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651-669, 1993.

BARROW, P. A. Salmonella em avicultura - problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, n.1, p.9-14,1999.

BARROW, P.A. The paratyphoid *Salmonellae*. **Review Science Technology**, v. 19, p.351-375, 2000.

BERCHIERI et al., Contaminação por Salmonella em farinhas de origem animal utilizadas no prepare de ração. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.4, p.83-88,1984 .

BERCHIERI JUNOR, A. Enfermidade das aves. In: BERCHIERI JUNIOR, A. e MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: **FACTA**, p.183-253, 2000.

BERCHIERI, J.R.A.; OLIVEIRA, G.; PINHEIRO, I.; BARROW, P.A. Experimental *Salmonella Gallinarum* infection in light laying hen lines. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31, p.50-52, 2000.

BOZIARIS, I. S.; ADAMS, M.R. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.105-113, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Sanidade avícola: Atos Legais**. Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994: Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola, no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. Brasília, 1994. p. 2-3

BRASIL. **Regulamento Técnico sobre as condições higiênico - sanitárias e de boas praticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos**. Brasília: MA/DAS/DNT, 1997.

BRASIL. Resolução RDC N. 12 de 02 de janeiro de 2001. Brasília: ANVISA/MS, 2001. Diário Oficial. **República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL, Portaria n. 46 de 10 de fevereiro de 1998. Brasília: MAPA, 1998. Disponível em: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/colsultalei?op=viewTextual&codigo=1139>. Acesso em 29 de fev.2008.

BUSARCEVIC, M.; KOJIC, M.; DALGALARRONDO, M.; CHOBERT, J.-M.; HAERTLÉ, T.; TOPISIROVIC, T. Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate

Lactobacillus salivarius BGHO1. **Oral Microbiology Immunology**, 23, p. 254-258, 2008.

CARLI, E.M.; FRIES, L.M.; TERRA, N.M.; FLORES, M.L.; PADILHA, A.D.; CAMPAGNOL, P.C.; VEIT, D.; FURTADO, A.; SANTOS, B. Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico no controle de *Salmonella* Enteritidis na indústria avícola. **Revista Nacional da Carne**, n. 357, p. 22-32, 2006.

CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 1-16, 1997.

CDC. Department of Health and Human Services. Center for Diseases Control and Prevention UNITED STATES, USA-Disponível em : <http://www.cdc.gov/cdc.gov>. Acesso em 10/jan2003.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. GARCIA, G.R. 2007. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo Minas Frescal por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, 37, 583- 587, 2007.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em Queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 101, 121-124, 2006.

CHI-ZANG,Y.; YAM, L.K.; CHIKINDAS, L.M. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.15-22, 2004.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

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.

COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p. 777-788, 2005.

CUTTER, C.N.; SIRAGUSA, G.R. Population reduction of Gram- safety of a fermented weaning food containing L-lactate and negative pathogens following treatments with nisin and nisin. **Journal of Food Protection**, 56, 414–417, 1995.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J.; BAILEY, J.S. Salmonella species. In: DOYLE, M.P., BECHAUT, L.R., MONTVILLE, T.J., eds. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. 2 ed.: ASM Press, Washington, 872p, 2001.

DALE, N. Probióticos para aves. **Avicultura Profesional**, Georgia, v. 10, n. 2, p. 88-89, 1992.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p.191-208, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; PÚBLIO, M.R.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal Microbiology**, 32, 32-37. 2001.

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

DIBNER, J.J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**. v.11, p.453-463, 2002.

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

DUFOUR, M.; SIMMONDS, R.S.; BREMER, P.J. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of natural antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, 85, p. 249-258, 2003.

ECKROADE, R.J. In: Proceeding of the Symposium on the Diagnostic and Control of Salmonella. **US Animal Health Association**, San Diego, CA. USA. p.14-20, 1992.

EDUARDO, M.B.P. 2005. Doença diarreica e outras relacionadas à transmissão hídrica e alimentar – aspectos programáticos, metodológicos e situação epidemiológica, São Paulo, agosto de 2005. BEPA, **Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD)**, setembro de 2005; 2-11.

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

FERNANDES, S. A.; GHILIARDI, A.C.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.; PIGNATARI, A.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n. 2, p.54-63, 2003.

FRIEDMAN, C.R. Public health risk from Salmonella-based rodenticides **Lancet**, n.347,p.1705-1706, 1996.

FULLER, R. 1989. A review: Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, 66, 365-378.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and dissemination of Salmonella serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, 63, p. 1749-1753, 2000.

GARCIA, G., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., MEDEIROS, A. A., CHIODA, T. P. Inhibition of the growth of pathogenic bacteria by *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 101 (559-560) : 263-268, 2006.

GELINSKI, J.M.L.N. **Bacteriocina de *Lactobacillus sake* 2^a: potencial de aplicação em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de *Salmonella* de origem alimentar**. 2003. 89f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) . Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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.

GILL, A.O., HOLLEY, R.A. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. **International Journal of Food Microbiology**, 80, 251-259, 2003.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; HELENUS, H.; SIITONEN, A. Reduced fluorquinolone susceptibility in *Salmonella enteritidis* serotypes intravelers returning from southeast Asia. **Emerging Infectious Diseases**. 2001.

HANCOCK, R.E.W. The bacterial outer membrane as a drug barrier. **Trends Microbiology**, v.5, p.37-42, 1997.

HELANDER, I.M.; SANDHOLM, T.M. Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, 60, 153-161, 2000.

HELANDER, I.M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Fluometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.213-219, 2000.

HENLEZ, D.J.; OPITZ, H.M. Role of rodents in the epidemiology of salmonella enterica serovar enteritidis and other Salmonella serovar in poultry farms. In: SAEED, A.M. Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals-epidemiology pathogenesis and control. 1ed. Ames: **Iowa State University Press**, p.331-340,1999.

HENZLER, D. J., OPITZ, H.M. The role of mice in the epizootiology of salmonella enteritidis infection on chicken layer farms. **Avian Disease**.1992.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Salmonella serovars isolated from feedstuff and poultry feeds in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, 18, p.21-27, 1998.

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

JAY, J. MODERN FOOD MICROBIOLOGY. 6.ed. Gaithersburg: **Aspen Publication**, 679p. 2000.

JI-DONG, JIN.; DONG-SEOK, LEE.; EUN-KYNG, S. HIN.; ROSE, JUNG.; TAE-WOOK, HAHH. Molecular Typing by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and detection of virulence genes of Salmonella enterica subspecies enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum. **Journal Veterinary Medicine Science**, 68 p. 1321-1326.

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.

JIN, L.Z.; HO, Y.N.; 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.

JUVEN, B.J.; SCHNED, F.; LINDNER, P. Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal Food Protection** ,55, 157-161, 1992.

KAKU, M., PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, A.S.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por

Salmonella Enteritidis, no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 129, p. 127-131, 1995.

KANASHIRO, A.M.I. Serovars of *Salmonella* spp. Isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal Poultry Science**, p.195-197, 2005.

KELLEY, T.R.; PANCORBO, O.C.; MERKA, W.C.; BANHARTS, H.M. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Science**, n.77, p.243-247, 1998.

KLAENHAMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-86, 1993.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.70, p.337-349, 1998.

KOO, F.C.W.; PETERSON, J.K.; CLIFFORD, W.H.; MOLINA, C. Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by citotoxin. **Inf. Imunity**, v.43, n.1, p.93-100, 1984.

KWON, Y.M.; RICKE, S.C. Induction of acid resistance of *Salmonella Typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p.3458-3463, 1998.

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

LE NY, P. Use of organic acids in poultry production. Mode of action and applications. In: FORUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA. Foz do Iguacu. **Anais...** Foz do Iguacu: Editora Animal World, 2005, p.158-165.

LEWUS, C.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. **Journal Microbiology Methods**, v.13, p.145-150.1991.

LÍRIO, V.S.; SILVA, E.A.; STEFONI, S.; CAMARGO, D.; RECCO, E.A.P.; MALUF, Y.T.; MIYAZAWA, T.T.; NEVES, D.V.D.A.; OLIVEIRA, V.M.R. Freqüência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Higiene Alimentar**, 12: 36-42,1998.

LIU, W.; HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small- protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis* . **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.2551-2558, 1990.

MACARI, M.; FURLAN, L.; GONZÁLES, E. Fisiologia aviária- Aplicada a frangos de corte; **FUNEP/UNESP**, 2002.

MAHADEO, M.; TATINI, S.R. The potential use of nisin to control *Listeria monocytogenes* in poultry. **Letters Applied Microbiology**, 18, 323-326, 1994.

MAIA, O.B. et al. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium*. **Veterinary Microbiology**, v.70, p.183-189, 2001.

MEDEIROS, A. A. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Lactobacillus sp* de conteúdo fecal de aves, visando seu uso como probiótico**. Jaboticabal: UNESP, 1998.67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) .

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

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

MIRANDA, J.B.N. Ocorrência de salmonela em farinhas utilizadas como matéria-prima na composição de rações de animais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 1978.

MONTVILLE, T. J.; KAISER, A. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. New York: **Academic Press**, p.1-22,1993.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K.; LUDESCHER, R.D. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **International Dairy Journal**, v.5, p.797-814, 1995.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINE, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Journal of Microbiology**, 31, 184-192, 2000.

NAHAISI, M. H. *Lactobacillus acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. Chapter 6. Em Robinson, R. K. (ed.), *Developments in Food Microbiology*, **Elsevier Applied Science Publishers**, Londres, RU. pp. 153-178,1986.

NIKAIDO, H. Outer membrane. In: NEIDHARDT, F.C.; CURTIS, R. *Escherichia coli* and *Salmonella*: celular and molecular biology. Washington: **ASM Press**, p.29-47, 1996.

NILSEN, T.; NES, I.F.; HOLO, H. an exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC 492. **Journal of bacteriology**, v. 180, p.1848-1854, 1998.

NILSSON, L.; NILSEN, M.K.N.G.Y.; GRAM, L. Role of acetate in production of an autoinducible class lia bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2251-2260, 2002.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 52, p 655-661, 2000.

PASCUAL, M. et al. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.11, p.4981–4986, 1999.

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. 103p. **Tese** (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**, v.2, 2 ed., São Paulo: Makron Books, 1996, p. 22.

PENZ JUNIOR, A.M.; SILVA, A.B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação de aves. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, Santos. **Anais...**, Campinas: **FACTA**, 1993, P.111-119.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F. Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella enteritidis*. **Saúde Pública**, Lisboa, v.32, n.5, 1998.

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

POMEROY, B. Fowl Typhoid. In: HOFSTAD MD, CALNEK CF, HELMBOLT WM, REID HW, YODER JR editors. **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa, State University Press; p. 100-116, 1987.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENER, L.L.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (n.44) to the Kauffmann-Write scheme. **Res. Microbiology**, v.152, n.10, p.907-909, 2001.

RABSCH, W.; HARGIS, B.M.; ISOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; HINZ, K.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella galinarum* in poultry. **Emerging Incidence Disease**, 2001.

RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Non-typhoid salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, 3, 237-247, 2001.

REZENDE, C.S.M. Ocorrência de salmonela em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Goiânia, 2002. 73f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária - Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

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

RIEMANN, H.; KASS, P.; CLIVER, D. *Salmonella enteritidis* epidemic. **Science**, 2000.

RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.V.; R. OWE, B. International increase in *Salmonella* Enteritidis phage typt 4: a new pandemic ?. **Epidemiology and Infection**, v.105, p.21-27, 1990.

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

ROSA, C. M.; FRANCO, B.D.G.M.; MONTVILLE, T.J.; CHIKINDAS, M.L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sakei* 2a. **Journal of Food Safety**, v.22, p.39-54, 2002.

ROSENAU, M.J. The inefficiency of bacterial viruses in the extermination of rats. *Publish Health Bulletin*. 1910.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA—SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology** 84, 197-215, 2000.

SALMINEN, S., ISOLAURI, E. E SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek** 70, 347-358, 1996.

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

SCHNEITZ, C.; HALONEN, U.; NURMI, E. Use of competitive exclusion to protect newly-hatched chicks against intestinal colonization and invasion by *Salmonella* Enteritidis PT4. **British Poultry Science**,33,p775-779, 1992.

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

SHIVRAPRASAD, H. L. Pullorum disease and fowl typhoid. **Revue Scientifique et Technique Office International Epizooties** , 19: 405-424, 2000.

SILVA, E.N.; REIS, R.; OLIVEIRA, R.L.; ÁVILA, F.A. Salmonelas em farinha de origem animal destinadas à fabricação de rações. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, 1973.

SILVA, P. L. Segurança alimentar e legislação na produção. In: **VII Simpósio Brasil Sul de avicultura**. Chapecó- SC. Embrapa Suínos e Aves. Abril, p. 34-40, 2006.

SIMÕES, M.; MARQUES, E.G.L.; ROCHA, M.M.M.; PRANDI, M.A.G.; PISANI, B. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. In: **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**; 2001; Foz do Iguaçu, Paraná. Brasil. p.413.

SIMON, L.; FREMAUX, C.; CENATIEMPO, Y.; BERJEAUD, J. M. Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6416-6420, 2002.

SONCINI, R. A. Controle de *Salmonella Enteritidis* na avicultura. In: **II SIMPOSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA**. 2002. Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa suínos e 6p.Aves. 2002.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p.3613-3615, 1991.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, 57, 3613-3615, 1991.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.

TAGG, J. R.; DAJANI, A.S.; WANNAMEKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, v.40, p.722-756, 1976.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p. 315-322, 1996.

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

USDA (United States Department Agriculture). FSIS (Food Safety and Inspection Service); 1998; Washington, DC, USA. www.usda.gov.

UZZAU, S.; BROWN, D.J.; WALLIS, T.; RUINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASADESUS, J.; PLATT, D.J.; OLSEN, J.E. Host adapted serotypes of *salmonella enterica*. **Epidemiol. Infect.** v.125, p.229-235, 2000.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology Reviews**, 56, 395–411, 1992. 1992.

VARMA, J.K.; MOLBAK, K.; BARRETT, T.J.; BEEBE, J.L.; JONES, T.F.; RABATSKY-HER, T. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. **Journal Infect Disease** , 191, p. 554-61 2005.

WEISS, L.H.N.; NONIG, R.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Ocurrance of *Salmonella* sp in finishing pigs in Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.22, n.3, p.104-108, 2002.

WHO - World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. **Report of a WHO Meeting**; Geneva, Switzerland, 1998.

WHO - World Health Organization. WHO consultation on the monitoring of antimicrobial usage in food animals for the protection of human health; 2001; Oslo, Norway.

APÉNDICE

Anexo A

Na Tabela 01, estão apresentados os valores da análise de variância obtida no tratamento “in vitro”, para verificar a inibição da multiplicação de *Salmonella Gallinarum* frente a *Lactobacillus acidophilus* e substâncias antimicrobianas.

Tabela 1. Análise de variância para a multiplicação de *Salmonella Gallinarum* nos tempos de 2, 4 e 6 horas de incubação a 37° C, em diferentes tratamentos (T1 a T10)*.

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr > Fc
Tratamento	9	3466,19	385,13	21,70	< 0,0001
Resíduo (A)	18	319,46	17,75		
Tempo	2	48,28	24,14	5,41	0,0081
Tempo x Tratamento	18	370,23	20,57	4,61	< 0,0001
Resíduo (B)	42	187,25	4,46		
Total	89	439,41			
CV1(%)	43,89				
CV2 (%)	22,00				
Média Geral	9,60				

Fc: valor do F calculado. Pr: probabilidade de se obter um valor de $F \geq Fc$. CV1(%): coeficiente de variação referente ao fator tratamento e CV2(%): coeficiente de variação referente ao fator tempo. * Tratamento 01: EDTA + *Salmonella gallinarum* isoladamente (controle positivo); Tratamento 02: EDTA + *Salmonella gallinarum* e nisina (500 U.I./mL); Tratamento 03: EDTA + *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL199; Tratamento 04: EDTA + *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* C1; Tratamento 05: *Salmonella gallinarum* + *Lactobacillus acidophilus* C1; Tratamento 06: *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL-199; Tratamento 07: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* isoladamente (controle positivo); Tratamento 08: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* e nisina (500 U.I./mL); Tratamento 09: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL; Tratamento 10: Ácido Acético + *Salmonella gallinarum* + *Lactobacillus acidophilus* C1.

Anexo B

Na Tabela 02 estão apresentados os valores da análise de variância obtida no tratamento “in vitro”, para verificar a inibição da multiplicação de *Salmonella Enteritidis* frente a *Lactobacillus acidophilus* e substâncias antimicrobianas.

Tabela 2. Análise de variância para a multiplicação de *Salmonella Enteritidis* nos tempos de 2, 4 e 6 horas de incubação a 37° C, em diferentes tratamentos (T1 a T10)*.

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr > Fc
Tratamento	9	1612963,79	179218,20	9,68	< 0,0001
Resíduo (A)	18	333146,51	18508,14		
Tempo	2	330419,27	165209,63	20,62	< 0,0001
Tempo x Tratamento	18	1104948,51	61386,03	7,66	< 0,0001
Resíduo (B)	42	336474,82	8011,31		
Total	89	900000,00			
CV1(%)	61,85				
CV2 (%)	40,69				
Média Geral	219,97				

Fc: valor do F calculado. Pr: probabilidade de se obter um valor de $F \geq Fc$. CV1(%): coeficiente de variação referente ao fator tratamento e CV2(%): coeficiente de variação referente ao fator tempo.* Tratamento 01: EDTA + *Salmonella Enteritidis* isoladamente (controle positivo);Tratamento 02: EDTA + *Salmonella Enteritidis* e nisina (500 U.I./mL);Tratamento 03: EDTA + *Salmonella Enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL199;Tratamento 04: EDTA + *Salmonella Enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* C1;Tratamento 05: *Salmonella Enteritidis* + *Lactobacillus acidophilus* C1;Tratamento 06: *Salmonella Enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL SL-199;Tratamento 07: Ácido Acético + *Salmonella Enteritidis* isoladamente (controle positivo);Tratamento 08: Ácido Acético + *Salmonella Enteritidis* e nisina (500 U.I./mL);Tratamento 09: Ácido Acético + *Salmonella Enteritidis* e *Lactobacillus acidophilus* ITAL ;Tratamento 10: Ácido Acético + *Salmonella Enteritidis* + *Lactobacillus acidophilus* C1.

Anexo C

Nas Tabelas 3 e 4, são apresentadas as análises de variâncias para os tratamentos realizados “in vivo”, para avaliar a inibição da multiplicação de *Salmonella Enteritidis* frente a agentes antimicrobianos e *Lactobacillus acidophilus*.

Tabela 3. Análise de variância referente ao isolamento de *Salmonella sp* por suabe cloacal em aves, nos tratamentos T1, T2 e T3*.

Fator de variação	Graus liberdade	deSoma Quadrados	deQuadrado médio	Fc	Pr > Fc
Tratamento	2	20,53	10,27	337,50	< 0,0001
Resíduo (A)	4	0,12	0,03		
Tempo	2	2,04	1,02	69,156	< 0,0001
Tempo x Tratamento	4	1,22	0,03	20,671	< 0,0001
Resíduo (B)	14	0,21	0,02		
Total	26	24,12			
CV1(%)	15,75				
CV2 (%)	10,98				
Média Geral	1,11				

Fc: valor do F calculado. Pr: probabilidade de se obter um valor de $F \geq Fc$. CV1(%): coeficiente de variação referente ao fator tratamento e CV2(%): coeficiente de variação referente ao fator tempo.* Tratamento1: (grupo controle positivo); Tratamento 2: (grupo controle negativo); Tratamento 3: *Lactobacillus acidophilus* e *S. enteritidis*.

Tabela 3. Análise de variância referente ao isolamento de *Salmonella sp* por suabe cloacal em aves, para o tratamento de: nisina (500 UI/mL), ácido acético (2,0%) e *S. Enteritidis*.

Fator de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr > Fc
Tempo	2	44909,05	22454,53	4,87	0,06
Resíduo	6	27650,66	4608,44		
Total	8	72559,72			
CV(%)	57,75				
Média Geral	117,55				

Fc: valor do F calculado. Pr: probabilidade de se obter um valor de $F \geq Fc$.

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](#)