

UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS E  
ÂLCOOL ETÍLICO NO CONTROLE DE  
*Salmonella* EM RAÇÕES AVÍCOLAS

HELENICE MAZZUCO

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO DIAS DE MORAES E SILVA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da  
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

---

Mazzuco, Helenice

M478u Utilização da própolis e álcool etílico no controle  
de *Salmonella* em rações avícolas. Piracicaba, 1994.  
98p.

Diss. (Mestre) - ESALQ  
Bibliografia.

1. Etanol como agente antibacteriano 2. Própolis co  
mo agente antibacteriano 3. Ração para ave doméstica -  
Contaminação - Controle 4. Salmonela em ração - Contro  
le I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,  
Piracicaba

CDD 636.508557  
589.95  
576.163

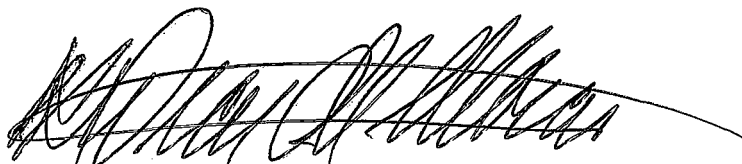
UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS E  
ÁLCOOL ETÍLICO NO CONTROLE DE  
*Salmonella* EM RAÇÕES AVÍCOLAS

HELENICE MAZZUCO

Aprovada em: 07.10.1994

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Roberto Dias de Moraes e Silva	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Fernando Machado Menten	ESALQ/USP
Prof <sup>a</sup> . Dra. Elizabeth Gonzales Machado	FCA/UNESP



Prof. Dr. ROBERTO DIAS DE MORAES E SILVA

Orientador

À Meus pais, Henrique (*in  
memorian*) e Helena, pela  
dedicação e carinho.

## AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - ESALQ/USP e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Campus de Jaboticabal - UNESP; pela acolhida ao curso de mestrado e à execução do fase experimental, respectivamente.

Ao Prof. Roberto Dias de Moraes e Silva (ESALQ/USP), e ao Prof. Angelo Berchieri Junior (FCAVJ/UNESP), pela valiosa orientação e pelo constante apoio durante a elaboração do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários do Laboratório de Ornitopatologia da FCAV, D. Cida e Sr. Antonio pela indispensável ajuda na condução dos trabalhos de laboratório.

Aos amigos, Danísio Prado Munari, Lúcia Helena Pereira Nóbrega, Gilberto Silber Schimidt, Luci Murata, Rosana Bessi e Verônica Oliveira Vianna pelo exemplo e amizade em todos os momentos.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
SUMMARY .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Incidência de <i>Salmonella</i> em produtos de ori- gem animal.....	3
2.1.1. Considerações gerais e situação mun- dial.....	3
2.1.2. Situação brasileira.....	6
2.1.2.1. Isolamento em humanos e nas maté- rias primas.....	6
2.1.2.2. Isolamento em carcaças de aves abatidas.....	10
2.2. Salmonelose.....	13
2.3. Presença de <i>Salmonella</i> em incubatórios comer- ciais.....	15
2.4. Presença de <i>Salmonella</i> em lotes de matrizes .	16
2.5. Presença de <i>Salmonella</i> em ovos comerciais ...	18
2.6. Fatores que influenciam a colonização por <i>Salmonella</i> .....	19
2.6.1. Idade da ave.....	19
2.6.2. Fatores de estresse.....	20
2.6.2.1. Enfermidades concomitantes ..	21
2.6.3. Efeitos da cama-de-frango.....	21
2.6.4. Resistência a agentes antimicrobianos	21
2.7. Métodos de controle e eliminação.....	23
2.7.1. Peletização.....	23
2.7.2. Irradiação.....	24
2.7.3. Utilização de carboidratos .....	25
2.7.4. Competição exclusiva.....	28
2.7.5. Agentes químicos.....	30

2.7.6. Vacinação .....	32
2.8. Própolis .....	33
2.8.1. Definição .....	33
2.8.2. Utilização da própolis pelas abelhas.	33
2.8.3. Composição da própolis .....	34
2.8.4. Atividade antibacteriana da própolis.	35
2.8.5. Outras propriedades da própolis.....	40
2.8.5.1. Propriedade antioxidante ...	40
2.8.5.2. Própolis como agente anticoc-	
cidiano.....	40
2.8.5.3. Propriedade antifúngica ....	41
2.8.5.4. Efeitos da própolis sobre	
parâmetros de crescimento...	42
2.9. Álcool etílico como agente antibacteriano...	43
2.9.1. Considerações gerais .....	43
2.9.2. Álcool etílico .....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	46
3.1. Local .....	46
3.2. Cepa da bactéria .....	46
3.3. Pré-enriquecimento .....	46
3.4. Ração.....	47
3.5. Procedimento experimental.....	47
3.5.1. Contaminação da ração (desafio).....	47
3.5.2. Método de aspersão dos agentes antiba-	
cterianos.....	49
3.6. Aves utilizadas no experimento.....	49
3.7. Alojamento das aves.....	49
3.8. Procedimento para detecção do número de orga-	
nismos de <i>Salmonella</i> nas aves - contagem ce-	
cal.....	50
3.9. Delineamento Experimental.....	51
4. Ensaios.....	52
4.1. Experimento nº 1.....	52
4.2. Experimento nº 2.....	53

4.3. Experimento nº 3.....	53
4.4. Experimento nº 4.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÊNDICE.....	90



## UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS E ÁLCOOL ETÍLICO NO CONTROLE DE *Salmonella* EM RAÇÕES AVÍCOLAS

Autora : HELENICE MAZZUCO

Orientador: PROF. DR. ROBERTO DIAS DE MORAES E SILVA.

### RESUMO

Em quatro experimentos foram avaliados como agentes antibacterianos, produtos como a própolis e álcool etílico, adicionados às rações artificialmente contaminadas com os respectivos sorotipos: *Salmonella typhimurium* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> nos três primeiros experimentos e, *Salmonella agona* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, *Salmonella infantis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> e *Salmonella enteritidis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, no 4º experimento. As rações foram fornecidas a grupos de 10-16 pintos de corte de um dia. Em todos os experimentos os produtos avaliados foram utilizados à 2% na ração. Quando se utilizou solução hidroalcoólica de própolis (Exp. 1), seguidas 120 horas após o desafio das aves, detectou-se a presença da bactéria nos cecos. No experimento seguinte (Exp. 2), testou-se a solução de própolis e o seu diluente, álcool etílico; seguidas 96 horas após o desafio das aves, não foi observado a presença da bactéria nos cecos, ( $<2,0 \log_{10}$ ). Avaliou-se no 3º experimento a ação da solução de própolis e do álcool etílico no tempo, adicionados à ração 14 dias e 28 dias antes do fornecimento às aves. Após 72 horas do desafio das aves, a leitura nas placas acusou a presença da bactéria nos cecos. Dentro deste último período (72 horas), também se avaliou a ação da própolis em pó, (extrato seco) e esse mesmo extrato numa solução aquosa, adicionados à ração 48 horas antes do fornecimento às aves e, os resultados confirmaram a presença da bactéria nos cecos. No 4º experimento avaliou-se somente o álcool etílico nas rações arti-

ficialmente contaminadas com os respectivos sorotipos, *S.agona* NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, *S.infantis* NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, *S.enteritidis* NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, registrando-se contagem zero ( $<2,0 \log_{10}$ ) apenas com o último sorotipo. Os resultados obtidos permitiram concluir que o tratamento com a solução de própolis apresentou ação sobre a *S.typhimirium* NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> somente quando em solução alcoólica, dentro de um período de 48 horas, indicando que o efeito bactericida se deveu ao álcool etílico presente na solução. A ação do tratamento com o álcool etílico demonstrou resultado parcial sendo observado efeito bactericida somente em relação a dois dos sorotipos inoculados na raça.

UTILIZATION OF PROPOLIS AND ETHYL ALCOHOL ON CONTROL OF  
*Salmonella* IN POULTRY FEEDS

Author : HELENICE MAZZUCO

Adviser: PROF. DR. ROBERTO DIAS DE MORAES E SILVA

**SUMMARY**

Four similar trials were conducted to evaluate the effects of dietary inclusion of an alcoholic solution of propolis and ethyl alcohol on control of salmonellae, artificially added in the feed offered to groups of 10-16 day - old broiler chicks. *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> was used in the first three experiments and *Salmonella agona* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, *Salmonella infantis* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> and *Salmonella enteritidis* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> were used in the fourth experiment. In every experiment the antibacterial products were added at 2% in the feed. When used hidroalcohol solution of propolis (Experiment 1), 120 hours after the challenge on the chicks, was detected the presence of bacteria on cecal contents. On the next experiment (Experiment 2), was tested the alcoholic solution of propolis and ethyl alcohol; 96 hours after the challenge on the chicks it was not observed the presence of bacteria on cecal content of the birds ( $<2,0 \log_{10}$ , FCU/g). In the third experiment, it was evaluated a propolis solution and ethyl alcohol, "in time with", added to feed 14 days and 28 days before the chicks consume the experimental ration. Seventy-two hours after the birds consume the *Salmonella* contaminated ration, the plaque counts demonstrated the presence of bacteria on cecal contents. Within the last period (72 hours), it was evaluated a powdered propolis sample (dehydrated extract) and, this extract in an aqueous

solution, added to the feed 48 hours before the birds started the consumption of ration; the results confirmed the presence of the bacteria on cecal contents. On the fourth experiment, was evaluated only ethyl alcohol in the feed artificially contaminated with the following serotypes: *Salmonella agona* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, *Salmonella infantis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, *Salmonella enteritidis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>. The results indicated zero counting ( $< 2,0 \log_{10}$  FCU/g), only with the last serotype. Under this experimental condition, propolis showed action over *S.typhimurium* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> only in alcoholic solution and 48 hours before birds consumed contaminated ration, showing that bactericidal effect was due to ethyl alcohol present in the solution rather than the propolis action. Ethyl alcohol showed bactericidal effects only over two serotypes artificially added in the feed pointing that didn't occur a standardized response.

## 1. INTRODUÇÃO

Com a finalidade de estudar a ação de agentes antibacterianos, sobre o controle da *Salmonella* em rações avícolas, o presente trabalho objetivou desenvolver métodos e estudar produtos como a própolis e álcool etílico, em sua ação, em eliminar e senão, reduzir a contaminação das rações por bactérias do gênero *Salmonella*.

Na avicultura, o controle da *Salmonella* depende de um monitoramento simultâneo, da produção dos pintinhos à criação, do abate ao processamento das carcaças.

As medidas gerais de profilaxia dificultam mas, não impedem a presença de bactérias nas granjas. Embora reconhecidamente a ração e seus ingredientes de origem animal estejam entre as principais fontes de infecção, nenhuma das medidas até então adotadas têm sido totalmente eficientes.

A emergência de resistência frente aos antibióticos, o alto custo de produtos como os ácidos orgânicos, a ineficiência dos probióticos, entre outras implicações, conduzem a maiores estudos sobre produtos como a própolis e o álcool etílico, que possam ser viabilizados após comprovada sua ação.

Além disso, as aves, tornam-se fontes potenciais de toxinfecções alimentares ao homem, através do consumo de qualquer derivado de origem avícola que esteja contaminado. Assim, a presença da *Salmonella* implica num impacto negativo sobre os produtos avícolas.

A suscetibilidade das aves à colonização por *Salmonella* decresce com a idade e o presente estudo, conduz

à prevenção durante a idade mais suscetível ou seja durante as primeiras semanas de vida da ave.

A intervenção durante o período inicial da criação, evita que as aves e posteriormente, as carcaças processadas venham apresentar contaminação por *Salmonella*.

Caracterizou-se o estudo através da pressuposição de que a própolis e o álcool etílico, tenham ação sobre os microrganismos na ração e tornem-se inócuos quando ingeridos pelas aves.

As limitações e mesmo a ausência de trabalhos na literatura à respeito da aplicação de própolis e do álcool etílico como agentes antibacterianos em rações avícolas atestam a importância e a originalidade do presente estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Incidência de *Salmonella* em produtos de origem animal

#### 2.1.1. Considerações gerais e situação mundial

A literatura concernente à presença de bactérias patogênicas em produtos de origem animal, conceituam particularmente as farinhas de origem animal como excelentes veiculadores de microrganismos do gênero *Salmonella* aos animais.

Há mais de quarenta anos, já havia relatos sobre a presença de salmonelas em alimentos para o consumo das aves, conforme EDWARDS *et al.*<sup>1</sup>, citado por WILLIAMS (1981), que isolaram *Salmonella typhimurium* e *S. bareilly* à partir desses alimentos.

ERWIN em 1955, trouxe um dos primeiros estudos de detecção de *Salmonella* à partir de "alimentos comerciais preparados" para o consumo das aves. A partir daí houve uma maior conscientização do papel das rações e subprodutos como disseminadores da *Salmonella* na avicultura industrial.

Bactérias do gênero *Salmonella* foram detectadas nas farinhas de ossos, sangue desidratado, farinha de carne e também na farinha de peixe (MULLER, 1952; BORING, 1958;

---

<sup>1</sup> EDWARDS, F.R.; D.W. BRUNER and A.E. MORAN (1948). The genus *Salmonella*: its occurrence and distribution in the United States. Ky Agric. Exp. Stn. Bull, 525(30).

QUESADA *et al.*, 1960; BORLAND, 1975).

MOREHOUSE e WEDMAN (1961), efetuaram um levantamento sobre os agentes patogênicos presentes em subprodutos de origem animal e mostraram que cinco produtos tiveram particular importância, devido à alta porcentagem de amostras positivas à *Salmonella*. Assim, subprodutos de abatedouro avícola, ovos, carne, farinha de carne e ossos e ração canina foram responsáveis por 71% do total de isolamentos. Os sorotipos que ocorreram com maior frequência foram *S. montevideo*, *S. senftenberg*, *S. typhimurium*, *S. cubana*, *S. infantis* e *S. oranienburg*. Os autores observaram que *S. typhimurium* foi o sorotipo que prevaleceu nos subprodutos avícolas e na ração.

Em 1962, BOYER *et al.* declararam, pela comparação de sorotipos isolados nos alimentos e animais, que a fonte comum de infecção foi o alimento consumido.

Conforme ZINDEL e BENNETT (1968), a incidência de salmonelas em rações avícolas e seus ingredientes foram determinados, sendo examinados, um total de 808 amostras oriundas de fábricas de rações comerciais. Foram identificados os sorotipos: *S. indiana* e *S. senftenberg* em farinha de carne e farinha de carne e ossos; *S. shwarzengrund* e *S. typhimurium* foram isolados respectivamente à partir de amostras de rações de perús reprodutores e perús em crescimento. *S. seigburg* e *S. oranienburg* foram isoladas de rações para aves poedeiras.

Para se detectar o nível de contaminação por salmonelas em amostras de farinha protéica animal (farinha de peixe, farinha de penas e farinha de carne), WILLIAMS JUNIOR *et al.* (1969), conduziram um estudo que abrangeu 311 amostras analisadas num período de 10 meses. Os autores chamaram a atenção para a maior frequência de isolamentos do sorotipo *Salmonella typhimurium*. A presença de *Salmonella* em lotes de farinha de carne foi detectada em



86% das amostras avaliadas, em 57% das amostras de farinha de penas e em 18% das farinhas de peixe no mesmo estudo.

Qualquer ingrediente utilizado na confecção da dieta animal, tem demonstrado vez ou outra conter salmonelas, mesmo as fontes vegetais como farelo de algodão e farelo de soja, conforme GRUMBLES e FLOWERS (1961), VANDERWAL (1979) e ISRAELSEN *et al.* (1994).

Sementes e grãos de oleaginosas possuem uma baixa incidência de contaminação por salmonelas (1-3%) comparados aos ingredientes obtidos à partir de subprodutos de origem animal (JOHN *et al.*, 1990).

As fontes de contaminação dos alimentos por salmonelas podem ser, conforme BOYD (1990): (1) os ingredientes (matérias-primas) das rações; (2) transporte; (3) estocagem (que inclui os ingredientes durante sua permanência no ponto de produção e mesmo na granja); (4) fábricas de rações.

Um passo importante no controle da colonização no trato digestivo do animal doméstico, é a utilização de ingredientes livres de salmonelas. Geralmente os ingredientes são submetidos a cozimento (peletização, extrusão) o que habitualmente elimina as bactérias, (MILES e BUTCHER, 1993). O problema consiste na recontaminação, que pode ocorrer em qualquer ponto de distribuição da ração.

A presença de salmonelas nos alimentos se constitui num problema contínuo pois, embora estes organismos não causem comumente, a doença nos animais que consomem esses alimentos, pode ocorrer no entanto, uma gastroenterite (toxinfecção) nas pessoas que consomem carne e derivados destes animais (HINTON e MEAD, 1992).

## 2.1.2. Situação brasileira

### 2.1.2.1. Isolamento em humanos e nas matérias-primas

Os estudos bacteriológicos, realizados em animais, abatedouros, matérias-primas de origem animal e mesmo no homem, oferecem um levantamento epidemiológico dos microrganismos patogênicos disseminados entre os animais e os seres humanos, (BERCHIERI JÚNIOR *et al.*, 1983).

No Brasil, há uma ausência geral de conhecimento sobre a incidência de salmonelose em nossos rebanhos domésticos, desse modo torna-se difícil julgar a significância da presença de *Salmonella* em subprodutos animais incorporados às nossas rações. Um dos primeiros isolamentos de salmonelas em animais domésticos no Brasil, foi feito em 1943, por PESTANA e RUGAI, que acompanharam o abate de suínos em "um matadouro municipal de São Paulo", obtendo amostras de gânglios mesentéricos de 100 animais. As bactérias foram isoladas em 15% deles, sendo identificados, *Salmonella schottmulleri*; *S. derby*; *S. anatis*; *S. cholerae suis*, var. Kunzerdof e *S. newport*.

Com o "intuito de contribuir ao estudo de epidemiologia das salmoneloses humanas", ASSUMPTÃO em 1946, examinou amostras de carnes bovina, suína, de aves e de carneiro, além das vísceras coletadas em açougues e derivados embutidos e os resultados mostraram a presença da bactéria em 15% deles sendo que a carne de origem suína apresentou o maior número de casos positivos.

Foram examinadas 170 amostras "de carnes preparadas" (linguiças de carne de porco, linguiças mistas, salichas e mortadelas), à venda no mercado varejista para se detectar a presença de *Salmonella*, conforme estudo de PESTANA e RUGAI (1947). O nível de contaminação das amos-

tras encontrado foi de 3,52% e os sorotipos isolados foram, *S.anatis*, *S.newport* e *S.minnesota*.

Embora o número de organismos que estão presentes nos subprodutos e nas rações seja indubitavelmente de importância na determinação (ou manifestação) da doença, já se detectou o estabelecimento de salmonelose nas aves, mesmo em nível bastante baixo (menos que uma célula de *Salmonella* por grama de alimento) (HENDERSON et al., 1960; SCHLEIFER et al., 1984).

O problema se amplia e se agrava quando relacionado com as toxinfecções alimentares, devido à *Salmonella* em saúde pública.

O primeiro levantamento, feito no Brasil a respeito da situação epidemiológica das enfermidades humanas causadas por enterobactérias, foi feito por TAUNAY (1968). Através de seu estudo, à partir de 1940, no Instituto Adolfo Lutz, "identificou com maior precisão os vários agentes etiológicos das síndromes de diarreias", caracterizando as salmonelas como causadoras da infecção intestinal em crianças e adultos. Com a introdução de novos métodos e técnicas bacteriológicas inexistentes até então no país, procedeu-se tanto ao isolamento como a diferenciação bioquímica das enterobactérias. Estabelecendo na cidade de São Paulo a frequência dos mais importantes agentes etiológicos da diarreia infantil, foram examinados 713 casos e se detectou a presença de *Salmonella* em 9,8% deles. Predominou o sorotipo *S.newport*, seguido por *S.typhimurium* e *S.derby*.

De 1950 à 1966, o mesmo autor realizou o isolamento de salmonelas em indivíduos adultos, sendo os principais sorotipos isolados e sua frequência respectiva: *S.newport* (19,88%) *S.anatum* (17,7%), *S.typhimurium* (11,12%) e *S.derby* (10%).

A contaminação das rações avícolas e seus ingredientes por *Salmonella* tem sido registrada por vários au-

tores. Avaliando diferentes partidas de farinha de carne e farinha de peixe fabricados no Brasil, GIORGI et al. (1971) efetuaram um levantamento à respeito da incidência de salmonelas nestes subprodutos. Foram isolados 4 diferentes sorotipos nas amostras de farinha de carne e apenas um sorotipo nas amostras de farinha de peixe. Os autores chamaram a atenção para o fato de que os sorotipos isolados, (*S. dublin*, *S. javiana*, *S. levingstone*, *S. meleagridis*, *S. infantis* e *S. lexington*) poderiam estar relacionados à casos de toxinfecções alimentares ocorridas anterior ao isolamento. Os autores também salientaram que a maioria das farinhas analisadas mostraram contaminação por coliformes e *Pseudomonas aeruginosa* sendo raras aquelas que não apresentaram contaminação alguma.

Pesquisando a presença de salmonelas em matérias-primas, como farinha de carne, peixe, ossos, sangue e outras, SILVA et al. (1973), detectaram um índice de contaminação positiva de 13,6% em 103 amostras analisadas.

MIRANDA et al. (1978), estudaram a ocorrência de *Salmonella* nas matérias-primas componentes das rações de aves, oriundas de diferentes locais do Brasil. O percentual de contaminação da farinha de carne foi de 40%, farinha de sangue 21% e farinha de penas 37%. Nas amostras de farinha de peixe examinadas não foram encontradas bactérias do gênero *Salmonella*. Os sorotipos isolados foram: *Salmonella oranienburg*, *S. senftenberg*, *S. anatum*, *S. agona*, *S. bornum* e *S. infantis*.

Amostras de concentrado, cama de galinheiro e carcaças de frango foram coletados em granjas de frangos de corte por CUNHA NETTO et al. (1982) que observaram a semelhança qualitativa entre os sorotipos isolados das amostras de uma mesma granja. Os autores discutiram que o sorotipo isolado em maior número nas granjas foi *S. typhimurium* e sua maior prevalência está em concordância com a maioria

das pesquisas sobre o assunto, demonstrando sua importância em saúde pública.

A importância da carne das aves, como fonte proteica à alimentação humana e o fato de veicularem salmonelas, tornando-se fonte de infecção ao homem, foi destacado por BERCHIERI JÚNIOR *et al.* (1983), num estudo sobre a presença da *Salmonella* em amostras de farinha de origem animal destinadas à fabricação de ração. A percentagem de amostras positivas na farinha de carne foi 14% e nas farinhas de penas 4%, sendo que as demais matérias-primas (farinha de sangue, farinha de peixe, farinha de ostra, farinha de ovo e farinha de vísceras), apresentaram um baixo percentual de positividade.

Após o isolamento de salmonelas à partir de amostras de matérias-primas e rações, GIRÃO *et al.*, (1983), sugeriram que medidas de controle mais rigorosas, principalmente em plantéis de reprodutores, devem ser estabelecidas, considerando a transmissão transovariana como um dos meios mais importantes de propagação e perpetuação das bactérias. Os materiais analisados, farinha de carne, farinha de penas, vísceras e restos de incubatório, concentrado e rações, mostraram um percentual total de bactérias isoladas igual à 14,9%. A contaminação de matérias-primas e rações foram consideradas pelos autores, como introdutores de salmonelas nos plantéis. Nesse mesmo estudo, foram examinados, fígado, baço, coração e restos de gema, coletados de aves com problemas sanitários, sendo identificados sorotipos comuns, tanto em matrizes de corte, como em matrizes poedeiras e frangos de corte, sendo os mais frequentes *S. gallinarum* e *S. pullorum*.

Conforme BERCHIERI JÚNIOR *et al.* (1984), a escassez de bibliografia nacional referente à prevenção de salmoneloses aviárias, culminou num estudo visando o isolamento e identificação de salmonelas em farinhas de origem animal,

comumente utilizadas para compor as rações. Assim, foram analisadas amostras de farinha de carne, de penas e vísceras e de ossos autoclavados, oriundas de três diferentes fábricas de ração situadas no Estado de São Paulo. De acordo com o isolamento feito, 38% das amostras examinadas eram portadoras de *Salmonella*. Os autores chamaram a atenção para o valor no percentual de isolamentos registrados se situarem de acordo com os valores citados na literatura a respeito.

Em relação aos isolamentos efetuados nas farinhas de penas e vísceras analisadas, 63% estavam contaminadas. Tal valor foi considerado bastante alto pelos mesmos autores, o que permitiu incriminar as farinhas de procedência avícola como contaminantes potenciais das rações.

A presença de *Salmonella* em frangos de corte, a nível de granja comercial, foi estudada por BERCHIERI JÚNIOR *et al.* (1989). Vinte e dois sorotipos de *Salmonella* foram encontrados nas amostras de farinha de carne, ração, cama das aves e fezes de rato, e a constatação da presença de 19 sorotipos de *Salmonella* em determinada amostra de farinha de carne, levou os autores à considerá-la como o principal agente contaminante, o que se dá através do consumo da ração pelas aves. A presença de *Salmonella* em fezes de ratos, coletadas na fábrica de ração anexa à granja sugerem uma outra fonte potencial de introdução da bactéria no ambiente de criação. Os autores argumentaram que a associação desses resultados devem ser considerados para "o estabelecimento progressivo de programas de controle sanitários efetivos e factíveis com os atuais sistemas de exploração avícola".

#### 2.1.2.2. Isolamento em carcaças de aves abatidas

Quando as aves consomem rações contaminadas por

salmonelas podem ou não apresentar a enfermidade paratífica, tornando-se neste último caso, portadores sãos, conforme VAUGHN *et al.* (1974). As aves sadias são responsáveis pela contaminação cruzada que se dá principalmente em abatedouros, comprometendo o produto final que será consumido pelo homem (carcaças, embutidos) ou participando como ingredientes (subprodutos) das rações. Dessa forma, a contínua reintrodução de salmonelas em plantéis avícolas estabelece um círculo vicioso que se inicia com o consumo da ração contaminada e se perpetua no ambiente, particularmente no frigorífico avícola.

Segundo BERCHIERI JÚNIOR *et al.* (1987), "a disseminação de salmonelas no meio ambiente, atingindo as aves e o homem, encontra no frigorífico um importante aliado".

A incidência da contaminação varia consideravelmente dependendo da incidência da infecção nos lotes de aves e tempo de viagem até o abatedouro.

Em frangos infectados, os cecos são os locais primários de localização da *Salmonella*, e a coprofagia anterior ao abate é um dos meios de contaminação cruzada, (MORAN JÚNIOR e BILGILI, 1989).

BAILEY *et al.* (1990) relataram que a *Salmonella* pode sobreviver nas penas e sobre a pele das aves e assim tornar-se uma fonte da contaminação cruzada das aves vivas e daquelas que vão para o abatedouro.

O rápido crescimento das bactérias pode ser associado ao acentuado estresse que ocorre durante o transporte levando a uma maior contaminação da ave abatida, assim o número de carcaças positivas à *Salmonella* aumenta rapidamente após a liberação do conteúdo intestinal, durante a evisceração e através da propagação que se dá entre as car-

caças nas operações da linha de abate (JONES et al.<sup>2</sup>, citado por MILES e BUTCHER (1993)).

A imersão no tanque de escaldagem, a passagem pelas máquinas depenadeiras, a evisceração manual e mecânica, a imersão nos "chillers", resultam na transferência e multiplicação das salmonelas entre as carcaças. Devido a tais peculiaridades do frigorífico avícola, as bactérias disseminam-se facilmente no ambiente, comprometendo a qualidade das carcaças e também os subprodutos que entram na composição das rações animais.

A mais alta tecnologia no abate e processamento das aves, atualmente não evita carcaças positivas à salmonelas, se aves infectadas são trazidas ao interior do abatedouro (MILES e BUTCHER, 1993).

Alguns estudos de isolamentos feitos em frigoríficos/abatedouros são relatados na literatura.

Comparando o isolamento de *Salmonella* à partir de amostras das cloacas das aves vivas, efetuadas nas diversas fases de processamento, ÁVILA et al. (1974), detectaram 5% de amostras positivas em cloacas e, após a evisceração, foi verificada a maior contaminação, 25%. Os sorotipos isolados nas amostras foram *S.pullorum*, *S.typhimurium*, *S.derby* e *S.anatum*. Os autores chamaram a atenção para a presença de sorotipos nas carcaças se registrar provavelmente pela introdução de aves portadoras no abatedouro, fato evidenciado pela detecção em material de cloaca.

BERCHIERI JÚNIOR et al. (1987), investigaram a presença de *Salmonella* à partir das fezes das aves que entravam no abatedouro, até os produtos finais (carcaça e subprodutos para farinha) e no total, foram isolados 9 dife-

---

<sup>2</sup> JONES, F.T.; R.C. AXTELL; F.R. TARVER; D.V. RIVES; S.E. SCHNEIDER, M.J. WINELAND. 1991. Environmental factors contributing to *Salmonella* colonization of chickens. In: BLANKENSHIP, L. (ed.) *Colonization control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry*, Academic Press, Orlando, Fla, pp.3-21.



rentes sorotipos, sendo *S.typhimurium* o mais frequente.

ALMEIDA e SILVA em 1992, verificando a participação da carga microbiana presente nas penas, espaço interdigital e tegumentos e, no trato digestivo, registraram a maior contagem nas operações de depenagem e evisceração, confirmando tais operações como pontos críticos da disseminação e contaminação das carcaças durante o abate. Particularmente, as bactérias presentes no trato digestivo chegaram à níveis de contaminação igual à 6,69 (média  $\log_{10}$  UFC/carcaça). Os autores mostraram também a contaminação cruzada que ocorre entre as carcaças, durante a passagem no tanque de resfriamento, fato já comprovado por LILLARD, em 1990. Nesse ponto, a ocorrência de salmonelas nas carcaças, atingiu níveis de 25% para 33% em um abatedouro e 8,3% para 17,7% em um outro abatedouro, respectivamente, antes do pré-resfriamento e logo após o mesmo. Os autores ressaltaram que todas as operações de abate, estão envolvidas na contaminação cruzada, sendo a contaminação intestinal (cecos), mais significativa do que a de origem cutânea.

Agentes de limpeza e desinfecção comumente utilizados nas operações de abate como o cloro, além de outros compostos derivados do cloro, amônia quaternária e iodo, reduzem mas não eliminam a bactéria do ambiente (MILES e BUTCHER, 1993).

## 2.2. Salmonelose

Uma das principais causas de toxinfecções de origem alimentar é a salmonelose. MORRONDO (1992) descreveu um conjunto de fatores sócio-econômicos que justificam o aumento na incidência da salmonelose em saúde pública. São eles:

- Aumento do número de refeições que se realizam fora de casa; a população economicamente ativa, geralmente realiza

seu almoço em locais coletivos: restaurantes, "self-services", refeitórios de empresas e escolas;

- Distribuição de refeições durante viagens marítimas ou aéreas;

- A criação de animais em grandes concentrações, submetidos à altas densidades, como nas granjas de frangos e suínos.

E outra série de fatores supõe alguns riscos de ocorrer a contaminação, diretamente relacionados aos primeiros relatados: grande quantidade de pratos a preparar, preparo antecipado, tempo e condições do transporte, aproveitamento de sobras e eliminação dos resíduos. Medidas higiênico-sanitárias são necessárias consequentemente, tanto para evitar a transmissão entre os animais e entre as pessoas como para impedir a contaminação, através dos alimentos de origem animal ou vegetal.

As salmonelas fazem parte de uma família de bactérias conhecida como Enterobacteriáceas e inclui várias espécies patogênicas para o homem e os animais. Existem mais de duas mil variedades de salmonelas conhecidas, porém a maioria dos relatos a nível mundial, têm sido confirmados geralmente em relação à *S. enteritidis*, seguida pela *S. typhimurium*.

Os sorotipos citados interessam particularmente ao estudo das salmoneloses por serem adaptadas à múltiplos hospedeiros, como os animais e o homem.

Por outro lado, existem variedades cujo hospedeiro natural é o homem, como a *Salmonella typhi* e também variedades adaptadas aos animais, como por exemplo, a *Salmonella cholerasuis*, adaptada aos suínos (WILLIAMS, 1972). No caso das aves, temos dois sorotipos específicos, *S. pullorum* e *S. gallinarum* e que causam, respectivamente, a pulorose e o tifo aviário, segundo o mesmo autor.

As salmonelas podem ser diferenciadas de outras enterobactérias e dentro do mesmo gênero com base em rea-

ções bioquímicas, incluindo-se o aspecto das colônias em meios diferenciais e a tipificação sorológica. O método atualmente utilizado é identificar as salmonelas baseando-se em seus antígenos de superfície (MILES e BUTCHER, 1993).

As salmonelas crescem e se multiplicam em uma larga faixa de temperatura, entre 5°C e 60°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento ocorre entre 25°C à 40°C, segundo os mesmos autores.

As salmonelas produzem no homem um quadro clínico não específico e, com frequência ocorrem diarreias, náuseas, febre e anorexia, sendo que, os primeiros sinais clínicos, surgem entre 12-72 horas após o consumo do alimento contaminado.

Pesquisadores do CDC (Centro de Controle de Doenças), E.U.A., estimam que 2 milhões de casos de salmonelose ocorrem a cada ano naquele país, 96% dos quais são causados pela ingestão do alimento contaminado, sendo muitos destes alimentos de origem avícola, conforme relataram MORRISON *et al.* (1993).

### 2.3. Presença de *Salmonella* em incubatórios comerciais

Conforme SNOEYENBOS (1971), a transmissão da *Salmonella* pelo ovo, como resultado da infecção transovariana ou mesmo pela passagem da bactéria, através da casca, ocorreu em lotes de matrizes e granjas multiplicadoras, e como consequência houve necessidade de um melhor controle sanitário nesse local.

COX e BAILEY (1989), detectaram a presença de salmonelas em pintos de um dia, (amostras de material cecal), antes da ingestão de qualquer alimento, caracterizando o incubatório como um ponto crítico de controle na colonização por *Salmonella* em frangos de corte.

Bactérias, incluindo a *Salmonella* podem penetrar

nos ovos, através da casca e as condições que existem durante a incubação favorecem a proliferação destes microrganismos, segundo COX *et al.* (1990a); desse modo, o incubatório comercial torna-se um reservatório potencial das bactérias, revelando a vulnerabilidade dos pintos de 1 dia à colonização bacteriana neste local.

A presença de *Salmonella* em incubatórios primários de matrizes pesadas (bisavós) foi avaliada à partir da amostragem dos ovos, material dos nascedouros (penugem) e material de piso das caixas de distribuição por COX *et al.* (1991). A porcentagem de amostras positivas para salmonelas variou de 1,3% a 36%, sendo os sorotipos isolados: *Salmonella berta*, *S. californica*, *S. give*, *S. hadar*, *S. mbandaka*, *S. senftenberg* e *S. typhimurium*.

Os autores consideraram baixa a incidência nas amostras positivas, quando se compararam os resultados com um incubatório comercial de matrizes, justificando o fato, pelo menor tamanho dos plantéis em questão e ao maior controle na desinfecção dos ovos (maior biossegurança), neste tipo de incubatório.

Um programa sanitário, incluindo efetiva desinfecção do ambiente, dos ovos, e dos materiais utilizados (correias, bandejas entre outros), colabora com a redução da contaminação por *Salmonella*.

#### 2.4. Presença de *Salmonella* em lotes de matrizes

Segundo HALL (1988), a *Salmonella enteritidis* é o principal sorotipo na transmissão transovariana, assim, uma vez presente na corrente circulatória da ave, o organismo se estabelece conseqüentemente nos ovários. Por essa rota, toda a descendência da ave torna-se comprometida e, assim, a contaminação crigina-se antes da incubação e passa a se refletir na elevada mortalidade dos pintos ainda nos ovos

ou nos primeiros dias de vida.

Após se reconhecer que a *Salmonella* pode ser introduzida através de 3 rotas principais: transmissão vertical (que normalmente implica em transmissão ovariana), transmissão horizontal, através de equipamentos, outros animais e mesmo o homem e, a transmissão pelo alimento (ração), McLLROY et al. (1989) relataram como uma organização de integração de frangos na Irlanda do Norte, conseguiu erradicar *Salmonella enteritidis* (PT4) de seus plantéis de aves reprodutoras.

Os autores discutiram que embora, a transmissão vertical resulte em sinais clínicos em aves jovens, a infecção pode se estabelecer em aves mais velhas, sem a manifestação de qualquer sinal aparente de redução na produção. Desse modo, a infecção torna-se firmemente estabelecida em lotes de aves reprodutoras em qualquer estágio da produção e permanece sem ser detectada, a menos que um efetivo programa de monitoramento se efetue nos plantéis. Qualquer procedimento deverá incluir o exame bacteriológico de amostras oriundas das aves e de sua progênie.

A transmissão vertical de *Salmonella enteritidis* creditada à granjas multiplicadoras de matrizes, foi observada por O'BRIEN (1990), devido à larga incidência desse sorotipo em diferentes países e num curto período de tempo. O autor argumentou que as companhias do setor dominam a distribuição mundial das famílias de avós, concentrando desse modo, a multiplicação e comercialização das mesmas. As aves muitas vezes são assintomáticas mesmo sendo portadoras da *Salmonella enteritidis* e, desse modo, os efeitos econômicos em relação à enfermidade são menos importantes que suas implicações em saúde pública.

O autor ainda discutiu que é provável, que a introdução inicial de *S. enteritidis* nos plantéis de reprodutoras pode ter se realizado através do consumo de matéria-

prima (ou mesmo raça) contaminada, porém, a fonte comum de infecção dos ovos e portanto das gerações subsequentes, ocorreu através da infecção congênita.

O sorotipo *Salmonella enteritidis* emergiu como um patógeno comum da avicultura nos anos setenta e tem sido relatado junto ao aumento de casos de toxinfecção no homem consumidor de ovos, e tornou-se um problema de saúde pública com sérias proporções em diversos países (COYLE *et al.*, 1988; ST. LOUIS *et al.*, 1988; COWDEN *et al.*, 1989b; PERALES e AUDICANA, 1989; STEVENS *et al.*, 1989; BLEEM, 1991; HASENSEN *et al.*, 1992).

A formulação de dietas que excluem, tanto quanto possível as matérias-primas que sabidamente apresentam um alto risco de contaminação por salmonelas, como os subprodutos de origem animal, já é prática rotineira em plantéis de matrizes reprodutoras (MILES e BUTCHER, 1993).

A substituição de algumas fontes de proteína animal por proteína sintética (aminoácidos sintéticos) também é prática alternativa como forma de prevenir a contaminação das aves por salmonelas. Um adequado programa de biossegurança, deve ser efetuado e mantido, de maneira a limitar a possibilidade dos organismos causadores da salmonelose, serem introduzidos na granja.

## 2.5. Presença de *Salmonella* em ovos comerciais

Um aumento na incidência de infecções por *Salmonella enteritidis* em humanos foi associado ao consumo de ovos tipo A, conforme relatou MORRIS (1989).

A toxinfecção alimentar causada por *Salmonella enteritidis* seguida após o consumo de ovos contaminados é reportada como uma das grandes preocupações em saúde pública (COYLE *et al.*, 1988; LYN *et al.*, 1988; COWDEN *et al.*, 1989a,b).

De acordo com o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, entre 1985 e 1990, um total de 10.676 casos de intoxicação alimentar foram relacionados à *Salmonella enteritidis*, sendo o alimento e os ovos contaminados, a fonte de infecção, segundo BLEEM (1991). A autora ainda relatou que a *Salmonella enteritidis* era um habitante normal da flora intestinal de vários animais, mas recentemente têm sido identificada como um patógeno invasivo em plantéis de poedeiras.

THIAGARAJAN *et al.* (1994) observaram que após a inoculação oral de *Salmonella enteritidis* em poedeiras, o mesmo sorotipo pode ser isolado à partir das membranas dos folículos pré-ovulatórios, durante as primeiras semanas de infecção, indicando como se dá a transmissão da bactéria através dos ovários para os ovos a serem ovipostos. Além dessa via existe a possibilidade dos patógenos serem carreados junto às fezes, pelo intestino e assim o contato da casca com as fezes pode levar à contaminação dos ovos.

## **2.6. Fatores que influenciam a colonização por *Salmonella***

### **2.6.1. Idade da ave**

Conforme MILNER e SCHAFFER (1952), a resistência das aves às enfermidades intestinais e à colonização por salmonelas aumenta com a idade. O rápido desenvolvimento da microflora intestinal aumenta a resistência das aves às infecções (SMITH, 1965; SOERJADILIEN e CUMMING, 1984).

SADLER *et al.* (1969) correlacionaram o nível da infecção, evidenciado pela excreção fecal de salmonelas viáveis, com a idade da ave e dose inoculada, mostrando que o nível de excreção das bactérias declinava rapidamente, conforme o período de tempo. Fato semelhante foi observado

por LINTON *et al.* (1985), em relação a infecção natural, sendo as taxas de excreção registradas, baixas no início, atingindo um pico durante 3 semanas e logo após declinando.

Conforme BARROW *et al.* (1988), as aves infectadas logo após a eclosão (nascimento), excretam maior número de salmonelas e por um período de tempo maior que as aves adultas.

COX *et al.* (1990b) argumentaram que as aves jovens são mais suscetíveis à colonização por salmonelas, do que as aves adultas devido a ausência de uma microflora intestinal madura.

#### 2.6.2. Fatores de estresse

Privação de água (jejum hídrico) e do alimento (restrição alimentar), têm demonstrado aumentar a suscetibilidade das aves à colonização por salmonelas, (BROWNELL *et al.*, 1969). As altas temperaturas e o estresse social (hierarquia no galpão) podem diminuir a resistência à colonização por salmonelas, em aves jovens (WEINACK *et al.*, 1985).

Anterior ao abate, as aves são submetidas a jejum por várias horas, transportadas em caixas, sob alta densidade, num espaço reduzido, submetidas à temperaturas excessivamente altas ou baixas, e todas essas condições conduzem à uma maior excreção fecal e disseminação da bactéria entre as aves (BAILEY, 1988).

A partir do momento que as aves passaram a ser criadas sob altas densidades populacionais, as condições para a coprofagia passaram a ter maior ocorrência, seja pelo estresse sofrido devido à superpopulação, seja pelas condições de manejo, como por exemplo, a restrição alimentar, que leva a ave a ingerir cama que pode estar contaminada.



### 2.6.2.1. Enfermidades concomitantes

A infecção simultânea por coccídias, contribui para o aumento da infecção por *Salmonella* nas aves (STEPHENS et al., 1964; STEPHENS et al., 1966; ARAKAWA et al., 1981; MORISHIMA et al., 1984).

BABA et al. (1985) evidenciaram experimentalmente que a multiplicação de *S.typhimurium* nos cecos das aves inoculadas artificialmente com *Eimeria tenella* foi associada com o decréscimo das concentrações de ácidos graxos voláteis (principalmente ácido isobutírico, isovalérico, valérico entre outros).

O comprometimento da integridade das células intestinais por coccídias parece aumentar a suscetibilidade à colonização por *Salmonella*, segundo BAILEY (1988).

### 2.6.3. Efeitos da cama-de-frango

Os níveis de umidade, pH e amônia são os fatores adversos à presença de salmonelas (TURNBULL e SNOEYENBOS, 1973).

Camas utilizadas contém um maior teor em umidade e geralmente um pH mais alto, além de níveis de amônia mais elevados, comparados às camas novas (JONES e HAGLER, 1983).

Uma menor suscetibilidade à colonização por salmonelas foi observada em aves criadas em camas velhas (já utilizadas anteriormente por um lote de frangos), quando comparadas com aves criadas em cama nova (SOERJADI-LIEM e CUMMING, 1984). Os autores comentaram que a cama velha forneceu às aves jovens uma flora intestinal protetora, que atuou evitando a colonização pelas salmonelas.

### 2.6.4. Resistência a agentes antimicrobianos

A utilização de antibióticos na terapêutica veteri-

nária e como promotores de crescimento tem levado, devido ao uso indiscriminado na avicultura, ao surgimento de resistência dos microrganismos à grande variedade de agentes antimicrobianos empregados nas rações.

SILVA *et al.* (1984) realizaram um estudo para verificar os níveis de resistência frente a 10 drogas antimicrobianas sobre sorotipos de salmonelas isolados de perús e aves reprodutoras. Os autores analisaram um total de 24 amostras, registrando-se a presença dos sorotipos *S. typhimurium*, *S. saint-paul*, *S. eimsbuettel*, *S. arizonae*. Os resultados surpreenderam devido aos baixos níveis de resistência às drogas antimicrobianas apresentados pelas bactérias (< 2,5 µg/ml), o que é explicado pelo fato das aves em questão, não estarem submetidas a uma pressão seletiva pelo uso de drogas, fenômeno observado em aves que estejam com alguma suspeita de infecção.

BERCHIERI JÚNIOR *et al.* (1985) estudaram a sensibilidade a antibióticos apresentada por salmonelas isoladas de rações ou seus ingredientes e mostraram que todos foram resistentes à bacitracina, à penicilina e à sulfazotrim (trimetoprim-sulfametoxazol). A resistência à tetraciclina atingiu um alto percentual, 77,1%. Os autores discutiram que no Brasil, dentre os antimicrobianos estudados, penicilina, bacitracina, furazolidona, tetraciclina e sulfato de colistina são usualmente adicionados às rações comerciais, como promotores de crescimento e, ao considerar os resultados, apenas o cloranfenicol e sulfato de colistina, podem ser empregados com segurança em terapêutica veterinária.

Os níveis de resistência aos aditivos antimicrobianos, denotam o efeito nocivo da utilização indiscriminada das drogas antimicrobianas, fato confirmado por BERCHIERI JÚNIOR *et al.* (1987).

A incidência de cepas resistentes isoladas em humanos, comparando-se os anos de 1981 e 1990, registrando-se

a resistência a um ou mais agentes antimicrobianos foi relatada por THRELFALL (1992). Para a *Salmonella enteritidis* houve um decréscimo em 1990, de 15% para 11%. Em relação à *S.typhimurium* houve um aumento na incidência de 36% para 54% e em relação à *S.virchow*, 16% para 76%. O autor ainda afirmou que os antibióticos usados na terapêutica humana não devem ser utilizados como aditivos promotores de crescimento adicionados às rações animais.

## 2.7. Métodos de controle e eliminação:

### 2.7.1. Peletização

Um produto totalmente livre de salmonelas ainda não é possível de ser obtido e a maioria das pesquisas sobre a eficiência da peletização em reduzir o número de bactérias são contraditórias.

RASMUSSEN *et al.* (1964) conseguiram eliminar as salmonelas artificialmente inoculadas em farinha de carne e ossos, quando submetidas a um tratamento térmico de 68,3°C por 15 minutos. Trabalhando com farinha de carne e ossos, naturalmente contaminadas (*S.bredeney* e *S.derby*) e contendo 10,7% de umidade, os mesmos autores mostraram que a temperatura exigida para eliminação das bactérias foi maior, 76,7°C durante 15 minutos. Em farinhas de penas, também naturalmente contaminadas (*S.montevideo*), a temperatura exigida para a eliminação das bactérias foi maior, 90,5°C por 7 minutos, segundo os mesmos autores.

LIU *et al.* (1969) mostraram que as salmonelas foram eliminadas quando um determinado ingrediente continha 15% de umidade e submetido ao aquecimento (88°C).

QUADRI e DEYOE (1975) investigaram a eficácia da peletização em temperatura alta (80°C) e normal e concluíram que, com ambas temperaturas obteve-se o controle e mes-

mo a eliminação da contaminação por *Salmonella* nos alimentos.

Contrariando os autores anteriores, COX *et al.* (1986) submeteram amostras de ração inicial de frangos e ração de poedeiras matrizes à peletização, após comprovar a presença de *Salmonella*, respectivamente, em níveis de 41% e 58%. Após o processamento (57-87°C), sob baixa e alta pressão, ambas as rações mostraram-se positivas à presença da bactéria (4%).

BROWN (1991) indicou que as salmonelas podem ser eliminadas quando a peletização ocorre no adequado tempo, adequada temperatura e nível de umidade, porém, nos sistemas convencionais de peletização, apenas as condições de umidade são atingidas e portanto, a peletização por si só não irá resultar no controle das salmonelas. O principal problema reside na recontaminação dos ingredientes após a sua peletização.

Resultados de um experimento recente, conduzido por ISRAELSEN *et al.* (1994) mostraram que a principal variável influente no processo da peletização em se obter uma redução satisfatória do número de salmonelas em amostras de farelo de algodão naturalmente contaminadas foi a temperatura.

### 2.7.2. Irradiação

EPFS e IDZIAK (1972) incorporaram vários sorotipos de salmonelas (*S. anatum*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. typhimurium*, *S. give*, *S. pullorum* e *S. typhimurium* S.II) viáveis por grama de ração avícola comercial, inoculando de  $3,5 \times 10^6$  à  $9,2 \times 10^7$  salmonelas viáveis, e trataram as rações subsequentemente com uma dose de radiação de 1,0 Mrad, conseguindo efetivamente eliminar as bactérias.

A irradiação foi superior ao tratamento térmico

(peletização, por exemplo), com relação à conservação do valor protéico do alimento, conforme WILLIAMS (1981), que ainda sugeriu a irradiação como tratamento terminal (final), aplicado ao alimento já na embalagem.

MORRISON *et al.* (1993) relataram que o Serviço de Inspeção de Alimentos (FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE - FSIS/USDA), aprovou à partir de 1992, a utilização da irradiação sobre produtos avícolas não cozidos, frescos ou congelados, incluindo carcaças inteiras ou em partes, como forma de eliminar microrganismos causadores da salmonelose, campilobacteriose e listeriose.

Uma outra vantagem seria a expansão das exportações de produtos avícolas irradiados, uma vez que os países importadores aumentam cada vez mais as restrições para entrada das carcaças e subprodutos.

### 2.7.3. Utilização de carboidratos

Outra proposta de controle da infecção por salmonelas nas aves é a possibilidade da administração de carboidratos junto à ração ou à água.

Sabe-se que a resistência das aves às doenças e à colonização por *Salmonella* aumentam com a idade. Se as condições à colonização se tornarem desfavoráveis durante as primeiras semanas de vida da ave, até a flora madura se estabelecer, então a incidência da *Salmonella* na ave adulta irá decrescer, segundo DE LOACH (1989).

Patógenos como a *Salmonella* devem se fixar no intestino de maneira a poder crescer e se desenvolver em número suficiente para causar enfermidades.

Conforme MORISHITA *et al.* (1982), a colonização por salmonelas ocorre no intestino delgado, provavelmente devido à menor motilidade, o pH alcalino e à ausência de enzimas digestivas. Assim, bloqueando-se a aderência ao epité-

lio intestinal, pode se evitar que as aves se tornem infectadas por bactérias do gênero *Salmonella*.

Nesse sentido, OYOFD *et al.* (1989a) mostraram que a D-manose, entre outros açúcares, possuía efeito inibitório sobre a aderência de *Salmonella typhimurium* nos cecos das aves (pintos de um dia). A adição de 2,5% de manose à água durante 10 dias, demonstrou significativamente reduzir a colonização por *S. typhimurium* resistente ao ácido nalidíxico e a novobiocina, (Nal<sup>r</sup>-Nov<sup>r</sup>) em até 21%, conforme concluíram os autores.

FRANK McHAN *et al.* (1989) concluíram que o tratamento com carboidratos e compostos afins (N-acetil-D-galactosamina, L-fucose, L-arabinose, D-manose) deve ser iniciado imediatamente após o nascimento das aves, pois os efeitos dos carboidratos parecem diminuir após a primeira semana de vida.

OYOFD *et al.* (1989b) desafiaram pintos de corte de 1 dia com 10<sup>8</sup> organismos de *S. typhimurium* resistentes ao ácido nalidíxico e a novobiocina, (Nal<sup>r</sup>-Nov<sup>r</sup>), diretamente através do papo. Foram avaliados os açúcares, dextrose, lactose, sacarose, manose e maltose a 2,5% na água consumida pelas aves, sendo que a maior redução foi observada particularmente nos grupos de aves tratadas com manose e lactose.

IZAT *et al.* (1990a) mostraram que não houve decréscimo na incidência de salmonelas nas carcaças de aves tratadas com D-manose à 2,5% na água durante os dez primeiros dias de vida.

A lactose, presente no soro do leite (proporção aproximada de 61%) é uma alternativa à utilização de lactose pura nos tratamentos para se reduzir o número de organismos de *S. typhimurium* em frangos de corte, conforme DE LOACH *et al.* (1990). Os autores adicionaram soro de leite na ração à 5%, durante os primeiros dez dias e concluíram

que o tratamento conseguiu reduzir significativamente ( $P < 0,05$ ) a concentração de salmonelas nos cecos.

O efeito da combinação de tratamentos, ou seja, lactose à 7% na dieta e organismos anaeróbios sobre a colonização cecal por *S. typhimurium* foi avaliado por ZIPRIN *et al.* (1990). As aves sob o tratamento conjunto, lactose mais organismos anaeróbios, demonstraram redução do número de bactérias por grama de conteúdo cecal, 10 e 15 dias após o desafio.

ZIPRIN *et al.* (1991) observaram que os tratamentos com lactose, foram suficientes para redução da colonização, porém melhores resultados foram obtidos quando as aves haviam sido inoculadas com culturas anaeróbias de flora cecal. Semelhantes resultados foram alcançados por CORRIER *et al.* (1991), trabalhando com perús inoculados através da cloaca com *S. senftenberg*. O tratamento conjunto com lactose e microflora intestinal adulta resultou em menores níveis de *Salmonella* nos cecos.

Lactose incluída nas proporções de 2,5, 5,0 ou 7,5% na ração de frangos de corte inoculados com *S. typhimurium* através da água, não demonstrou qualquer efeito de proteção à contaminação das carcaças de frangos, conforme WALDROUF *et al.* (1992). Parâmetros como peso corporal e consumo durante todo o período experimental, foram reduzidos significativamente com a inclusão de lactose nas dietas conforme observaram os autores.

Um maior número de organismos de *S. typhimurium* ( $P < 0,05$ ) no conteúdo cecal das aves que receberam lactose na dieta foi detectado por CORRIER *et al.* (1993). Igualmente, no mesmo experimento, os números de culturas cecais positivas para *Salmonella* decresceram ( $P < 0,01$ ) à 55% quando as aves receberam culturas fecais (flora microbiana) e lactose.

TELLEZ *et al.* (1993) associaram a resistência a

invasão por *Salmonella enteritidis* não somente com o aumento na concentração de ácidos orgânicos mas também à mudanças morfológicas na mucosa dos cecos, induzidas pela lactose ingerida pelas aves junto à dieta.

A ação de frutooligossacarídeos na dieta de frangos de corte à 0,375% sobre a contaminação por salmonelas nas carcaças foi estudada por WALDROUF et al. (1993). O referido carboidrato não reduziu consistentemente o número mais provável (NMP) das salmonelas apresentado pelas carcaças das aves.

Em todos os trabalhos citados o número de salmonelas presentes nos cecos ou nas carcaças foram ou não reduzidos através da utilização de determinados carboidratos, contudo, as bactérias não foram totalmente eliminadas, permitindo assim a possibilidade da disseminação contínua do patógeno ao ambiente. Além disso, a viabilidade em se utilizar tais açúcares em situação de campo como agente controlador da *Salmonella* nas aves é limitada por seu alto custo.

#### 2.7.4. Competição exclusiva

O fenômeno da competição exclusiva é baseado, sobretudo na administração oral de flora intestinal (cultura de microrganismos anaeróbios), obtida à partir de aves adultas livres de *Salmonella* à aves jovens.

O controle da infecção por *Salmonella* através da competição exclusiva foi alcançado pela primeira vez na Finlândia em 1973, conforme os introdutores da técnica, NURMI e RANTALA.

Mais recentemente, misturas definidas de bactérias do intestino de aves adultas têm sido utilizadas para os mesmos fins. Essencialmente, o tratamento por "competição exclusiva" é profilático e quando utilizado antes do desa-



fio com *Salmonella*, tem se mostrado efetivo à nível de laboratório com até  $10^6$  salmonelas/ave (MEAD e BARROW, 1990). Essa proteção efetiva geralmente é alcançada sob as condições laboratoriais de teste, porém, quando utilizada em larga escala não garante a proteção até o final da vida da ave (abate), fato confirmado em experimento realizado por GOREN *et al.* (1988).

ANDERSON *et al.* (1984) e SNOEYENBOS *et al.* (1985), não obtiveram resultados satisfatórios com a administração de flora intestinal adulta no intuito de proteger as aves da infecção por salmonelas.

SCHLEIFER (1985) argumentou que a técnica da "competição exclusiva" é válida pois aumenta a resistência das aves à colonização bacteriana e assim reduz a contaminação ambiental por patógenos, como a *Salmonella*.

Trabalhando com material cecal oriundo de frangos e perús, SCHNEITZ e NUOTIO (1992) confirmaram que ambas culturas, conferiram proteção à ambas espécies de aves, contra *Salmonella infantis*.

A proteção contra a infecção por *Salmonella typhimurium* foi alcançada por aves desafiadas com  $10^8$  e  $10^9$  organismos de *Salmonella* aos 3 dias de idade, conforme COX *et al.* (1992). O tratamento consistiu na aplicação das culturas de microrganismos diretamente no interior do ovo (embriões com 18 dias). Os autores estabeleceram que fornecendo-se esta proteção de maneira precoce, ainda no ovo, as aves adquirem resistência antes do contato com o ambiente, além disso possibilita uma nova alternativa de aplicação do tratamento comercialmente.

O tratamento conjunto, utilizando carboidratos e culturas de microrganismos anaeróbios têm demonstrado reduzir a incidência de *Salmonella* nos cecos, conforme ZIPRIN *et al.* (1990, 1991); CORRIER *et al.* (1991).

### 2.7.5. Agentes químicos

Agentes químicos acidificantes têm sido usados largamente na nutrição de monogástricos pois auxiliam a função digestiva, principalmente a nível de intestino. Outros demonstram ser inibidores de fungos (VANDERWAL, 1979; HUMPHREY e LANNING; 1988).

Uma alternativa ao controle da *Salmonella* na ração, é adicionar agentes químicos aos ingredientes ou à própria ração e os ácidos graxos de cadeia curta como o ácido fórmico, ácido propiônico, ácido láctico, entre outros, têm mostrado ação nesse sentido.

Conforme HINTON e LINTON (1988), tais produtos não devem ser tóxicos nas concentrações utilizadas e devem permanecer no alimento sem sofrer qualquer degradação até serem consumidos.

Um composto formado basicamente por ácido propiônico, álcool isopropílico e ácido fosfórico, foi incorporado à uma amostra de ração artificialmente contaminada com *S. heidelberg*, conforme estudo de WESTERFELD et al. (1970). Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando que os aditivos químicos não foram efetivos na eliminação da *Salmonella heidelberg* a níveis de 500 e 2000 organismos por grama de alimento.

Ração inicial de frangos, farinha de peixe e farinha de carne e ossos foram inoculadas artificialmente com *Salmonella senftenberg* 775W ( $2 \times 10^6$  células viáveis/grama de alimento) e posteriormente tratadas com os aditivos utilizados no experimento anterior (ácido propiônico, álcool isopropílico, ácido fosfórico), nas proporções 0,1 e 0,2%, conforme DUNCAN et al. (1972). Os resultados mostraram que os níveis do aditivo utilizado não foram efetivos sobre as salmonelas.

O ácido propiônico têm um largo emprego em matérias-primas especialmente no combate a fungos (VANDERWAL, 1979). Em uma série de experimentos, o mesmo autor comparou o efeito de diferentes concentrações dos ácidos fórmico, acético, propiônico e láctico sobre as salmonelas em rações fareladas, concluindo que o ácido fórmico demonstrou ser efetivo, através do menor número de dias necessários à redução do número de bactérias. O autor comentou que a descontaminação da ração foi alcançada com sucesso após a adição de 0,9% de ácido fórmico porém, houve apenas redução do número de organismos viáveis e portanto, não ocorreu a eliminação total das bactérias.

HINTON e LINTON (1988) adicionaram ao componente protéico de uma ração de frangos de corte, uma solução de ácido fórmico ou, uma solução de ácido fórmico e propiônico à 0,6% e de 0,5-0,68%, respectivamente, obtendo redução e mesmo eliminação das salmonelas presentes naturalmente ou artificialmente (*S. kedougou*) na ração. A mistura de ácido propiônico e fórmico adicionada à ração, uma semana antes do desafio com as salmonelas, forneceu proteção a subsequente recontaminação.

A adição de ácido fórmico ou formato de cálcio (forma em pó, menos cáustica), não apresentou resultado satisfatório em reduzir a incidência ou nível de *Salmonella typhimurium* nos cecos de frangos ou nas carcaças processadas, conforme estudo de IZAT et al. (1990b).

Ácido propiônico adicionado à dieta na proporção de 30 µmol/grama de ração consumida por aves de um dia, desafiadas por via oral aos 3 dias de idade com  $10^4$  organismos de *Salmonella typhimurium* Na<sup>r</sup>/Nov<sup>r</sup>, não foi efetivo no controle da colonização a nível de papo e cecos, conforme HUME et al. (1993). Concluíram que o decréscimo do número de salmonelas naqueles locais, em um dos experimentos, ocorreu provavelmente, devido à presença de uma bactéria an-

ti-salmonela e não ao ácido propiônico da dieta. Num outro experimento, dentro do mesmo estudo, o número  $\log_{10}$  UFC (unidades formadoras de colônia) de *Salmonella* aumentou de 4,0  $\log_{10}$  para 6,0  $\log_{10}$  ou mesmo 7,0  $\log_{10}$  nos cecos das aves com 9 dias, quando comparadas às aves controle, ao se utilizar 0,6% de ácido propiônico na forma seca (pó) e 0,5% numa aplicação na forma líquida.

#### 2.7.6. Vacinação

BARROW *et al.* (1990) afirmaram que a grande vantagem da vacinação é o desenvolvimento da imunidade frente à uma reinfecção; porém, a excreção fecal da cepa não é reduzida conforme experimento conduzido com aves de 4 dias de idade, infectadas experimentalmente com uma cepa invasiva de *Salmonella typhimurium* F98.

A eficácia das vacinas "vivas" atenuadas foi estabelecida por BARROW *et al.* (1991) que verificaram um efeito protetor sobre as aves com esse tipo de vacina.

Conforme MILES e BUTCHER (1993) a vacinação não elimina todos os organismos presentes na ave, contudo uma menor invasão dos órgãos internos e do trato reprodutivo ocorre. A colonização do tubo digestivo por *Salmonella enteritidis* também é reduzida com a utilização da vacinação conforme os autores. A vantagem desse fato consiste na redução da incidência da contaminação fecal por *Salmonella enteritidis*, por exemplo, da superfície externa dos ovos.

O estresse imposto às aves durante a vacinação e o custo das vacinas são algumas das desvantagens à serem consideradas ao se adotar tal medida profilática num plantel.

## 2.8. Própolis

### 2.8.1. Definição

Própolis é um nome genérico, que inclui as substâncias coletadas pelas abelhas (*Apis mellifera* sp.), à partir de fontes vegetais que geralmente não recebem uma denominação botânica específica (WALKER e CRANE, 1987). Estas secreções são encontradas em cascas de árvores, sob a forma resinosa ou então nas gemas ou botões da inflorescência das plantas. Além do material bruto, obtido à partir das plantas, as secreções das glândulas bucais da abelha são adicionadas após a coleta (BROW, 1989). Para os apicultores, a coleta e comercialização da própolis representou uma nova alternativa de renda.

A produção da própolis possibilitou a criação de métodos de manejo, que foram adaptados e melhorados, aumentando assim a quantidade de própolis produzida pelas abelhas, como por exemplo, a sobreposição de telas próximas à tampa da caixa que obrigam as abelhas a "propolisar" ou seja, cobrir essas telas com própolis. Desse modo, há possibilidade de se elevar a quantidade de própolis produzida por caixa.

### 2.8.2. Utilização da própolis pelas abelhas

As abelhas utilizam a própolis, para cobrir frestas e rachaduras, que porventura ocorram na colméia ou caixa, para reforçar a fina parede dos favos e, além desse uso "reparador" do ambiente, as abelhas utilizam a própolis para embalsamar possíveis invasores, como formigas e outros insetos (GUISALBERTI, 1979).

Dessa forma, a própolis evita a putrefação e a

disseminação de doenças na colméia, atuando na desinfecção do ambiente, eliminando fungos, bactérias e outros parasitas indesejáveis.

### 2.8.3. Composição da própolis

As substâncias químicas encontradas na própolis são citadas em bibliografias mais antigas, de forma genérica, nas proporções: 55% de resinas e bálsamos, 30% de cêra, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (CIZMÁRIC e MATEL, 1970; ARQUILLUE e BENITO, 1987; PUTKAMMER, 1988; BROW, 1989). Para estudar a composição e os constituintes da própolis, o método usual é a extração da fração solúvel em álcool separada da fração insolúvel (fração que contém a cera) (GUISALBERTI, 1979).

MERESTA e MERESTA (1982) avaliaram vários solventes conforme sua capacidade em extrair as substâncias antibacterianas da própolis e concluíram que a combinação com melhor atividade antibacteriana, foram extratos combinados de álcool metílico, éter, acetona e clorofórmio.

A própolis, bem como outros produtos da colméia variam em sua composição devido à diversidade da flora apícola de uma determinada área, período de coleta, clima, presença da cêra, modo de incorporação das diversas substâncias confeccionadas pelas abelhas (MERESTA e MERESTA, 1983; TOTH, 1985).

Pelo motivo exposto, há dificuldade, segundo o último autor, em definir a própolis como um produto de uso medicinal, a partir do momento que a qualidade do mesmo, varia grandemente. Embora a padronização seja possível à princípio, testes de controle de qualidade ainda não foram propostos.

Muitos estudos sobre as propriedades e composição da própolis são efetuados, sem se conhecer a origem botânica das secreções coletadas, que originam a própolis

(WALKER e CRANE, 1987).

Recentemente, GREENAWAY *et al.* (1990), utilizando a técnica combinada da separação e identificação denominada Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa, viabilizou a descoberta da presença de vários constituintes da própolis.

Há mais de 50 anos é reconhecida a presença de pequenas quantidades de vitaminas na própolis, conforme HAIDAK *et al.* (1938).

Vitamina B1, B2, B6, E, ácido ascórbico, ácido nicotínico e ácido pantotênico, foram detectados, e também os minerais Fe, Ca, Al, Va, Sr, Mn e Si. Além destes, detectaram-se as presenças de Na, K, Mg, Ba, Zn, Cd, Ni, Ag, Cu, Co e Mo (SCHELLER *et al.*, 1977).

Como demonstrado por GREENAWAY *et al.* (1990), o maior grupo de compostos isolados são os pigmentos flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), e que são encontrados com frequência na natureza, unicamente em vegetais, conforme VERÍSSIMO (1989). Aos flavonóides presentes na própolis, são atribuídas as propriedades antibacterianas e antifúngicas (LAVIE, 1960; VILLANUEVA *et al.*, 1970; VERÍSSIMO, 1989; GRANGE e DAVEY, 1990).

#### 2.8.4. Atividade antibacteriana da própolis

Kivalkina<sup>3</sup>, citado por GUIALBERTI (1979), contribuiu em 1948, com a primeira investigação sistemática sobre a atividade antibacteriana da própolis. Demonstrou a atividade bacteriostática contra *Streptococcus aureus*, bacilo tifóide e outras bactérias. Em 1960, LAVIE demonstrou a atividade bacteriostática da própolis sobre *Bacillus*

---

<sup>3</sup> KIVALKINA, B.P. Pchelavodstvo, 10, 1948.

*subtilis*, *B. alvei* e *Proteus vulgaris*. Um efeito menos pronunciado sobre *Salmonella galinarum*, *S. pullorum* e *S. dublin* foi notado. O autor atribui às substâncias isoladas, galangina e pinocembrina (flavonóides) como parcialmente responsáveis por tal atividade.

PRADO FILHO et al. (1962) estudaram o comportamento de uma série de microrganismos frente a ação antimicrobiana da própolis. A amostra preparada em solução etanólica mostrou ação, tanto sobre microrganismos gram-negativos como gram-positivos.

Powers<sup>4</sup>, citado por GUIALBERTI (1979), estudou o efeito antibiótico de vários flavonóides (20 tipos diferentes), em cepas de salmonelas, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e outros microrganismos, e observou que todos os compostos apresentaram atividade inibitória sobre os microrganismos testados.

Num estudo detalhado sobre a atividade antimicrobiana da própolis, LINDENFELSER (1967) avaliou 15 diferentes amostras, coletadas em vários locais nos E.U.A., e em várias estações do ano, sendo que os extratos testados, mostraram atividade inibitória marcante sobre 25 espécies, entre 39 observadas *in vitro*.

Extratos de própolis demonstraram ampliar o efeito de certos antibióticos (Yalovitsyn<sup>5</sup> e Kivalkina<sup>6</sup>, citados por GUIALBERTI, 1979).

A ação da biomicina, tetraciclina, neomicina, poli-

<sup>4</sup> POWERS, J.J. Proceedings IV Int. Symp. Fd. Microbiol., (Goteborg Sweden), pp.59-75, 1964.

<sup>5</sup> YALOVITSYN, M.V. (1965). The effect of bee poison, honey flower pollen and bee glue on antibiotics and sulfonilamides activity. *AKAD. HOUK. KAZ. SSR* 8:156-161.

<sup>6</sup> KIVALKINA, B.P.; GORSHUNOVA, V.I. (1969). Combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Fitontsidy Mater Soveshch*, 6:103-105.



micina, penicilina e estreptomicina contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foi mais pronunciada com a adição da própolis como meio nutriente (CHERNIAK, 1973; KIVALKINA e GORSHUNOVA, 1973). Ácido cafeico, um componente isolado da própolis, mostrou atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *C. difterie* e *P. vulgaris*, segundo CISMARIK e MATEL (1970). Esses autores demonstraram em 1973, a atividade antibacteriana do ácido ferúlico (presente na própolis) contra determinadas bactérias gram-negativas e gram-positivas.

Scheller<sup>7</sup>, citado por MERESTA e MERESTA (1983), demonstrou após a análise de milhares de amostras de própolis, oriundas de diferentes locais, a atividade bacterios-tática em aproximadamente 40% delas. Diferenças na atividade bactericida da própolis foram observadas por MERESTA e MERESTA (1980), e após a medição do pH, concluíram que entre um valor de pH igual a 6,0-6,8, a atividade foi estável, sendo os valores para concentração inibitória mínima igual a 60 µg/ml e a concentração mínima bactericida, 120 µg/ml. Os resultados apresentados foram similares a todas as amostras. Os autores observaram também que com altos valores de pH, a atividade bactericida decresceu.

Trabalhando com amostras de própolis extraídas de uma mistura de acetona, éter etílico e acetato etílico, MERESTA e MERESTA (1983) concluíram que aproximadamente 67% das amostras examinadas demonstraram atividade bacterios-tática sendo a concentração mínima inibitória numa faixa igual a 60 µg/ml à 430 µg/ml e a concentração bactericida mínima, 110 µg/ml a 1380 µg/ml. Um preparado à base de antibióticos com própolis foi testado contra cepas de *S. aureus*, isolados de abscessos que mostraram resistência ao tratamento com antibióticos (KEDZIA e HOLDERNA, 1986). Se-

---

<sup>7</sup> SCHELLER, S. *Pszczelarstwo*, 8, 5, 1980.

gundo os autores, em 70% dos testes a concentração inibitória mínima foi menor apenas com o antibiótico sozinho e, a mistura de própolis com oxitetraciclina, gentamicina ou bacitracina foi mais efetiva.

*Staphylococcus epidermidis* foi utilizado como amostra representativa de 14 tipos de estafilococcus isolados no leite de vacas afetadas por mastite, conforme IBRAGIMOVA e PANKRATOKA (1986). A sensibilidade das culturas de micróbios a 6 tipos de antibióticos, foi comparada, pelos autores, a um meio de cultura contendo própolis (extrato com 146 mg de própolis para 1 ml de álcool). A presença da própolis reduziu qualquer crescimento gradual de tolerância do *Staphylococcus* aos antibióticos.

A atividade antibacteriana da própolis (oriunda de Cuba), foi pesquisada por VALDES *et al.* (1989). Um total de 91 amostras de própolis foram coletadas em diferentes apiários, em diversas estações do ano. Extratos alcoólicos da própolis foram testados *in vitro* e todas as amostras mostraram atividade antibacteriana. O efeito antibiótico maior foi notado contra bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*). Um efeito menos pronunciado foi notado em bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*). Os autores comentaram que a atividade antibacteriana não diferiu em sua resposta dentro de um mesmo mês, em diferentes anos ou entre apiários.

Mastite aguda foi tratada utilizando um extrato de própolis, em 146 vacas, sendo observada a completa recuperação em 86,6% dos animais, segundo MERESTA *et al.* (1989). A recuperação total foi notada em 100% dos casos, conforme os autores, causados por *Candida albicans*. (levedura), em 85% dos casos afetados por *Escherichia coli*, 91% por *Staphylococcus* e 84,3% por *Streptococcus*. Concluíram que a

própolis foi bastante efetiva na terapia da mastite, causada por microrganismos resistentes à antibióticos.

ROJAS e CUETARA (1990), comparando a atividade antibacteriana de um extrato alcoólico de própolis, com 6 antibióticos convencionais (penicilina, critromicina, tetraciclina, estreptomicina, ampicilina e chloranfenicol), mostraram que de 100 cepas de *Staphylococcus aureus* em meio agar, expostas a 8 mg de própolis, 85 foram sensíveis, em contraposição à sensibilidade de 10 cepas expostas à 3 ou mais antibióticos.

O crescimento de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Branhamelia catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus cereus* foi completamente inibido na presença de própolis em diluição 1:20 (peso:volume), segundo GRANGE e DAVEY (1990). Os autores atribuíram aos flavonóides presentes na própolis a atividade antibacteriana mostrada.

Vários extratos alcoólicos de própolis foram testados contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus* sp., conforme relataram OBREGON e ROJAS (1990). Os resultados variaram conforme o método de extração, porém, foram independentes da concentração alcoólica utilizada na extração. A atividade antibacteriana da própolis sobre *Bacillus subtilis* ATCC663B, foi verificada por RIBAK e SZCZESNA (1991) utilizando diferentes solventes orgânicos da própolis. Concluíram que o melhor índice de atividade antibacteriana ou, nº log de bactérias mortas por concentração de própolis, foi alcançado com uma solução de própolis à 70% em etanol. A solução etanólica à 96% foi a próxima melhor, seguida por acetato etílico e acetona.

## 2.8.5. Outras propriedades da própolis

### 2.8.5.1. Propriedade antioxidante

A propriedade da própolis como antioxidante é relatada na literatura por vários autores.

A atividade antioxidante de um extrato em etanol de própolis foi estudada, utilizando como material de teste, banha, óleo de linhaça e óleo de canola, segundo KACZMARECK e SNELA (1982). No estudo, o extrato de própolis numa concentração de 0,05%, mostrou metade do efeito do propil galato (à 0,05%), um antioxidante utilizado normalmente nos alimentos.

Os efeitos da própolis na peroxidação dos lipídeos e enzimas lisossomais no intestino delgado de ratos foram estudados por OKONENKO (1988). Os ratos foram experimentalmente infectados com *Salmonella typhimurium* e seguida 1 hora após o desafio, forneceu-se 2 mg de própolis e observou-se uma redução na extensão das mudanças metabólicas associadas à infecção por *Salmonella*.

Em um meio de incubação, contendo  $1,75 \times 10^{-5}M$  de peróxido de hidrogênio e  $2 \times 10^{-5}M$  de luminol, testou-se a propriedade antioxidante de um extrato etanólico de própolis, conforme KROL et al. (1990). Com 0,13 mg do extrato etanólico da própolis obtiveram um máximo de inibição de 86%.

### 2.8.5.2. Própolis como agente anticoccidiano

A administração oral de própolis (em álcool 95%), durante 4 semanas à coelhos (Branco Semi-Gigante), fornecida em 2 concentrações, 3% e 2% (24 ml da solução alcoólica de própolis em 800 ml de água e 16 ml da solução alcoólica

em 800 ml de água, respectivamente) causou uma redução significativa ( $P < 0,1$ ) na excreção de oocistos de *Eimeria*, conforme HOLLANDS *et al.* (1984). As reduções foram 72% para os animais que consumiram 2% da solução alcoólica e 92% para aqueles que consumiram 3% desta solução.

Trabalhando com coelhos de 45 dias de idade, infectados com *Eimeria magna*, *E. media* e *E. perforans*, HOLLANDS *et al.* (1988), administraram oralmente por 2 semanas, 3% de uma solução hidroalcoólica de própolis e compararam 0,2% de sulfadimidina e 0,1% de sulfaquinoxalina e o álcool, utilizado na diluição da própolis, foi o controle. Concluíram que os efeitos coccidiostáticos da própolis representando a maior porcentagem de redução, foi superior às duas sulfonamidas e apontam a própolis como uma nova opção de tratamento à coccidiose com a vantagem de ser um produto menos tóxico.

Em ensaios clínicos envolvendo 138 pacientes, um extrato de própolis mostrou-se eficaz no tratamento da giardíase, infecção causada por protozoários que se instalam no intestino delgado e, efeitos colaterais da administração de própolis aos pacientes não foram observados, segundo MIYARES *et al.* (1988).

Trabalhando, *in vitro* com o protozoário *Giardia lamblia*, TORRES *et al.* (1990), observaram a ação de um extrato alcoólico de própolis sobre o crescimento do parasita, sendo avaliadas 3 concentrações (3,0; 5,8 e 11,6  $\mu\text{g/ml}$ ). A inibição do crescimento foi superior à 40%, em todas as concentrações testadas, sendo que a mais alta concentração indicou 98% de inibição.

#### 2.8.5.3. Propriedade antifúngica

Estudando os componentes da própolis, METZNER *et al.* (1975) concluíram que os compostos, pinobanksina-3-ace-

tato, pinocembrina, éster benzílico do ácido p-coumárico e éster do ácido caféico, mostraram atividade anti-fúngica significativa.

MILLET et al. (1987) comparando a atividade anti-fúngica da própolis com outras drogas sobre diferentes tipos de fungos que causam infecções em humanos, detectaram uma melhor eficácia da própolis. Observaram que a própolis demonstrou uma melhor atividade na presença de propileno glicol, notando-se o resultado principalmente contra o fungo *Scopulariopsis brevicaulis*.

A aplicação de 10% de uma geléia de própolis (petroleum jelly), foi utilizada em testes *in vivo*, contra a dermatomicose bovina, causada pelo fungo *Trichophyton verrucosum*, segundo LORI (1990), que observou uma recuperação mais rápida da pele afetada. Testes *in vitro* realizados pelo autor, com concentrações de própolis entre 5 e 10%, indicaram que não houve qualquer crescimento do fungo.

#### 2.8.5.4. Efeitos da própolis sobre parâmetros de crescimento

Frangos com 21 dias de idade foram tratados por 15 dias com uma dose diária de 20 mg de um extrato de própolis, segundo GIURGEA et al. (1981). Os principais efeitos observados incluem mudanças na concentração sanguínea do colesterol, atividade da transaminase, proteínas totais, gamaglobulinas, aminoácidos livres e, foram relacionados com o período de tratamento. O aumento em gamaglobulinas e proteínas e o decréscimo em aminoácidos, sugere, conforme os autores, que a própolis possui um efeito anabólico e que também estimule a resposta imunitária.

GUBICZA e MOLNAR (1987) estudaram o efeito da adição de uma tintura de própolis (20%) em doses de 2-5 ml, fornecidas pela manhã e à noite, à dieta láctea de bezerros

jovens. O grupo que recebeu a própolis, 47% desenvolveram diarreia, embora 58,8% dos bezerros do tratamento controle, também tenham desenvolvido diarreia. Um aumento no peso dos bezerros, alimentados com própolis, foi observado em uma taxa mais rápida (127 g/dia) que os animais controle.

## 2.9. Álcool etílico como agente antibacteriano

### 2.9.1. Considerações gerais

Vários álcoois têm demonstrado propriedades antibacterianas (BANDELIN, 1977; LYNN, 1983; HUGO e RUSSELL, 1992). Embora o modo de ação dos álcoois sobre as células bacterianas seja desconhecido, duas teorias podem ser mencionadas com relação ao seu efeito antibacteriano conforme Dagley et al.<sup>9</sup>, citados por BANDELIN (1977).

1- Ação de desnaturação protéica sobre as células bacterianas,

2- Interferência no metabolismo, por exemplo, a inibição da produção de certos metabólitos essenciais para a divisão celular.

HUGO e RUSSELL (1992), também confirmaram a primeira teoria observando que o álcool atua sobre os microrganismos, através da desnaturação protéica não-específica, quando utilizado em concentrações de 60-80%, porém não afeta os esporos de bactérias (ação não esporicida).

Os álcoois utilizados para desinfecção possuem uma rápida e abrangente atividade bactericida e entre outros, LYNN (1983), cita o metanol, álcool isopropílico, bronopol, chlorbutol, feniletanol, álcool benzílico, apresentando tal atividade.

STICKLER e KING (1992) lembraram que a resposta de

---

<sup>9</sup> DAGLEY, S., DAWES, E.A., MORRISON, G.A. J. Bact. 60, 369-79, 1950.

uma comunidade de micróbios a um desafio à partir de um agente antibacteriano como o álcool etílico, irá depender de uma série de fatores, como o pH, a temperatura, presença de inativadores bioquímicos, taxa de crescimento do organismo entre outros, o que irá influenciar de modo significativo o resultado.

### 2.9.2. Álcool Etílico (ETANOL)

O álcool etílico pode ser obtido por processos químicos e bioquímicos; nos primeiros, a matéria-prima é constituída pelos gases residuais das refinarias de petróleo e, nos processos bioquímicos, a matéria-prima, é de origem agrícola (CESAR *et al.*, 1971). Segundo o mesmo autor, em nosso país, considerando-se que a disponibilidade de melação ou mel final das usinas de açúcar é muito grande e que a nossa indústria química com base no petróleo é incipiente, o álcool produzido é todo ele proveniente daquele sub-produto. Desta forma, a produção do álcool, entre nós, está intimamente relacionada à produção açucareira.

O álcool etílico, particularmente, mostra características desejáveis que justificam sua maior utilização na desinfecção e como antisséptico, conforme descreveu BANDELIN, (1977): sua maior disponibilidade, ausência de odor, baixa toxidez, e ação bactericida (mais do que bacteriostática). Relatou que muitas tinturas germicidas (mercúrio-cromo, mertiolato) e compostos contendo amônia quaternária são dissolvidos em álcool etílico, como garantia de que tais substâncias eliminem de fato as bactérias.

Numa concentração à 70% (volume/volume) e pH 3,0 foram necessários 15 segundos para a eliminação total da *Salmonella typhi*, porém com pH 5,0 foram necessários 30 segundos para a eliminação, conforme experimento realizado



por Bandelin<sup>9</sup> citado por BANDELIN (1977), testando diferentes concentrações do álcool etílico em diversos valores de pH em sua ação bactericida.

Algumas vacinas contém o álcool etílico como conservante, conforme LYNN (1983). O álcool etílico é bastante letal às bactérias não esporulantes e destroem micobactérias (*Mycobacterium* spp), segundo Croshaw<sup>10</sup>, citado por HUGO *et al.* (1992).

---

<sup>9</sup> BANDELIN, F.J. Unpub. work, 1958.

<sup>10</sup> CROSHAW, W. The destruction of mycobacteria. In: **Inhibition and destruction of the microbial cell.** (ed. HUGO, W.B.). PP.419-49. London: Academic Press (1971).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local

Os quatro experimentos descritos a seguir foram desenvolvidos nas instalações do Departamento de Patologia Veterinária, no Setor de Ornitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal/ SP .

#### 3.2. Cepa da bactéria

A cepa utilizada nos três primeiros experimentos foi *Salmonella typhimurium* F98, resistente ao ácido nalidíxico (Nal<sup>r</sup>) e à Spectinomicina (Spec<sup>r</sup>) (STM F98 Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>), mantida sob refrigeração no laboratório de Ornitopatologia FCAV/UNESP.

No experimento subsequente (4º), foram utilizados os sorotipos *Salmonella agona* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, *S. enteritidis* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> e *S. infantis* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>.

A escolha dos sorotipos foi baseada na prevalência dos mesmos em surtos em saúde pública.

#### 3.3. Pré-enriquecimento

Para o desafio das rações, as culturas das bactérias (conforme o sorotipo), foram diluídas em caldo nutriente e incubados a 37°C por 24 horas em banho-maria com agitação. A cultura final apresentou um inóculo para o de-

safio contendo, aproximadamente,  $10^8$  organismos viáveis por mililitros (ml).

### **3.4. Ração**

Foi utilizada ração farelada de frangos de corte (fase inicial), isenta de antibióticos, coccidiostáticos e sem qualquer matéria-prima de origem animal, preparada na fábrica de ração da FCAV/UNESP.

A composição da ração é apresentada na Tabela 1. A ração foi autoclavada à  $121^{\circ}\text{C}$  para total esterilização e logo após, levada à estufa para secagem.

### **3.5. Procedimento experimental**

#### **3.5.1. Contaminação da ração (desafio)**

Pequenas porções da ração receberam gotas da cultura que foi previamente diluída, em dosagem conhecida ( $10^8$  organismos viáveis/ml), em caldo nutriente. Com o auxílio de um almofariz e pistilo, homogeneizou-se pequenas quantidades da ração que haviam recebido a cultura.

**TABELA 1.** Composição da ração experimental - ração inicial - 0-21 dias.

Ingredientes	Quantidade (% de ração)
Milho	58,377
Farelo de soja	35,378
Óleo vegetal	2,256
Fosfato bicálcico	2,138
Calcáreo calcítico	0,952
Suplemento Vitamínico/Mineral	0,500
Sal	0,400
COMPOSIÇÃO NUTRITIVA CALCULADA	
E.M.(Energia Metabolizável) 3000 kcal/kg	(%)
Proteína Bruta	21
Cálcio	0,999
Fósforo disponível	0,501
Metionina	0,4892
Metionina + cistina	0,8384
Lisina	1,1496
Triptofano	0,2837
Treonina	0,8282
Ácido linoléico	2,4124
Sódio	0,1590

Posteriormente, todo o material (ração com as salmonelas) foi agitado no interior de sacos plásticos, sendo então vedados por um nó e permanecendo no laboratório até receberem os tratamentos com os agentes antibacterianos.

### **3.5.2. Método de aspersão dos agentes antibacterianos**

Para a distribuição dos agentes antibacterianos na ração, foi utilizada uma válvula de aspersão manual, acoplada a uma recipiente de vidro graduado.

No interior de sacos plásticos, a ração recebeu as gotículas da aspersão, sendo todo o material agitado posteriormente para a completa homogeneização.

### **3.6. Aves utilizadas no experimento**

Pintos de um dia, da linhagem Hubbard não sexados, procedentes de um incubatório comercial foram utilizados, num total de 10 aves para cada tratamento, com exceção do experimento nº 1, onde se utilizaram 16 aves por tratamento.

### **3.7. Alojamento das aves**

Foram preparadas caixas de madeira com tampa telada através de desinfecção adequada, anterior à chegada das aves e, que permaneceram por todo o período experimental numa sala com entrada controlada e pedilúvio contendo solução de amônia quaternária. Cada caixa recebeu 2 comedouros tipo calha e 1 bebedouro tipo copo de pressão, todos higienizados e submetidos à esterilização em autoclave.

O piso das caixas foi coberto com plástico e sobre este, várias camadas de papel, para conter a umidade, ori-

unda das dejeções das aves.

Lâmpadas incandescentes localizadas entre cada 2 caixas foram ligadas 24 horas antes da chegada dos pintinhos, de modo a fornecer iluminação e calor.

Os bebedouros receberam água clorada e autoclavada e, nos comedouros, as rações foram distribuídas conforme o tratamento, ficando disponíveis às aves para consumo *ad libitum*.

### **3.8. Procedimento para detecção do número de organismos de *Salmonella* nas aves - Contagem Cecal**

Após o desafio, cujo período foi distinto para cada experimento, as aves foram sacrificadas através de deslocamento de pescoço e o conteúdo cecal removido para se estimar o número de bactérias presentes. O conteúdo dos cecos foi colocado no interior de frascos com tampa rosqueada que haviam sido previamente pesados. Após a adição, cada frasco foi novamente pesado, sendo que pela diferença de peso obtinha-se o peso do conteúdo cecal, e assim, esse material recebia a quantidade adequada de tampão fosfato (PBS) pH 7,4, logo após sendo homogeneizado através de um agitador de tubos.

O passo seguinte foi a diluição decimal seriada em tubos ELISA, contendo 0,9 ml de PBS (pH 7,4), partindo-se da amostra pura até chegar à diluição  $10^{-6}$ .

De cada diluição aproximadamente, 0,1 ml foi reti-

rado e pipetado em placas de ágar Verde Brilhante (VB) contendo ácido nalidíxico (100 µg/ml) e Spectinomícina (25 µg/ml). As placas foram divididas em 3 quadrantes sendo que cada divisão recebeu 2 gotas do material diluído.

Após verificar a secagem das gotas nas placas, estas foram colocadas em estufas e incubadas à 37°C por 24 horas. O resultado consistiu na estimativa do número de células viáveis de *Salmonella* por grama de conteúdo cecal, transformado em  $\log_{10}$  ou seja, a leitura referiu-se à Unidade Formadora de Colônias/g (UFC/g). O método de contagem adotado foi o mesmo utilizado por BERCHIERI JÚNIOR e BARROW (1990), sendo o limite mínimo de detecção igual a 10 UFC por quadrante ou diluição.

### 3.9. Delineamento Experimental

O delineamento adotado no estudo foi o Delineamento Inteiramente Casualizado com 10-16 repetições, sendo cada parcela constituída por uma ave.

A proposta do estudo foi a completa eliminação da contaminação na ave (contagem nula ou  $< 2,0 \log_{10}$ ) e resultados intermediários (baixa contagem) não constaram no objetivo do trabalho. Desse modo, os resultados obtidos não necessitaram de suporte estatístico sendo as conclusões baseadas em comparações efetuadas entre as aves controle e as aves que receberam ração contaminada e tratada com a solução alcóolica de própolis ou álcool etílico.

#### 4. Ensaio

##### 4.1. Experimento nº 1 (Realizado em Agosto de 1992)

Como um primeiro ensaio *in vivo*, objetivou-se testar a própolis em solução hidroalcoólica à 20% em 2 kg de ração. Anterior ao início do ensaio com as aves, foi determinado o pH das amostras de ração, com e sem a própolis e da solução de própolis em etanol, sendo os valores respectivamente iguais a 5,61; 5,52 e 3,77. A contaminação e o tratamento da ração foram realizados 24 horas antes da chegada das aves.

As aves foram separadas em grupos de 8, sendo duas repetições para o tratamento e duas repetições para o controle totalizando 16 aves para cada grupo.

Após o alojamento, as aves foram desafiadas, através do consumo de ração e seguidas 120 horas, foram sacrificadas para a retirada do conteúdo cecal.

O tratamento no primeiro experimento é mostrado na Tabela 2 e os resultados, nas Tabelas 1 e 2 do Apêndice.

TABELA 2. Grupos - Experimento nº 01.

Nº	Grupos
1	Ração contendo própolis (Solução Hidroalcoólica <sup>1</sup> ) + STM F98 <sup>2</sup>
2	Controle (Ração + STM F98)

1 Solução Etanólica de Própolis (60%/40%) - 40 ml de Solução de Própolis Hidroalcoólica à 20% em 2 kg de ração.  
 2 *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, resistente aos antibióticos Ác. Nalidíxico e Spectinomícina.



#### 4.2. Experimento nº 2 (Realizado em Janeiro de 1993)

No 2º experimento, o objetivo foi testar a própolis em solução alcoólica (etanólica) e seu respectivo diluente, o álcool etílico.

Foi utilizada própolis comercial, cuja composição é: Própolis = 40%, solução etanólica = 60%.

Grupos de 10 aves foram distribuídos, dentro de cada um dos 3 tratamentos à seguir:

1 = Própolis em Solução Etanólica à 2% na ração + STM F98.

2 = Álcool Etílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) 90ºGL, p.a., à 2% na ração + STM F98.

3 = Ração controle (apenas com STM F98).

O desafio e o tratamento da ração foram realizados 48 horas antes da chegada das aves.

No 4º dia após o alojamento, procedeu-se ao sacrifício das aves, para a remoção do conteúdo cecal e avaliação do número de organismos viáveis de STM F98 NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>/g.

As contagens nos tratamentos 1 e 2 foram iguais a zero ou seja, < 2,0 células viáveis de *Salmonella typhimurium*/g de conteúdo cecal.

A contagem das bactérias no grupo controle é apresentada na Tabela 3 do Apêndice.

#### 4.3. Experimento nº 3 (Realizado em Novembro de 1993)

Baseando-se nos resultados, obtidos no 2º experimento, o estudo proposto para o experimento nº 03 foi avaliar a ação dos agentes antibacterianos no tempo ou seja, as rações receberam os tratamentos aos 28 e aos 14 dias

antes do desafio com a bactéria.

Nesse mesmo experimento, testou-se a própolis sem a presença do álcool, isto é, a própolis em pó (extrato seco) com o álcool já volatilizado.

Os tratamentos foram:

#### I. RAÇÕES TRATADAS AOS 28 DIAS DE ANTECEDÊNCIA AO DESAFIO

- 1 = Própolis em Solução Etanólica (40:60) à 2% na ração
- 2 = Álcool Etílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) 90°GL, p.a., à 2% na ração

#### II. RAÇÕES TRATADAS AOS 14 DIAS DE ANTECEDÊNCIA AO DESAFIO

- 1 = Própolis em Solução Etanólica (40:60) à 2% na ração
- 2 = Álcool Etílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) 90°GL, p.a., à 2% na ração

#### III. TRATAMENTOS REALIZADOS COM 48 HORAS DE ANTECEDÊNCIA AO FORNECIMENTO DAS RAÇÕES ÀS AVES

- 1 = Própolis Extrato Seco + Água destilada esterilizada q.s.p. à 2% na ração
- 2 = Própolis Extrato Seco à 2% na ração

**OBS:** Todas as rações foram desafiadas no mesmo dia, 48 horas antes do fornecimento às aves.

Grupos de 10 aves foram distribuídos aos tratamentos acima descritos. A retirada do conteúdo cecal para a contagem do número de bactérias foi realizada 72 horas após o alojamento. Os resultados em UFC/g e na base  $\log_{10}$ , são apresentados respectivamente nas Tabelas 4 e 5 do Apêndice.

#### 4.4. Experimento nº 04 (Realizado em Janeiro de 1994)

Com o experimento nº 04 objetivou-se testar o álcool etílico como agente antibacteriano, em rações artificialmente contaminadas com os respectivos sorotipos: *S. agona* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>; *S. infantis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> e *Salmonella enteritidis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>.

Grupos de 10 aves foram distribuídos aos seguintes tratamentos:

- 1 - Ração contaminada com *S. agona* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> tratada com álcool etílico, à 2%
- 2 - Ração contaminada com *S. agona* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> (controle)
- 3 - Ração contaminada com *S. infantis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> tratada com álcool etílico, à 2%
- 4 - Ração contaminada com *S. infantis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> (controle)
- 5 - Ração contaminada com *S. enteritidis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> tratada com álcool etílico, à 2%
- 6 - Ração contaminada com *S. enteritidis* Na<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> (controle)

As rações controle receberam 40 ml de água destilada para manter as condições de umidade similares às das rações tratadas. Todas as rações foram desafiadas e tratadas no mesmo dia, 48 horas antes do fornecimento às aves. A retirada do conteúdo cecal para a contagem do número de bactérias foi realizada 72 horas após o alojamento das aves. Os resultados em UFC/g e na base log<sub>10</sub> são apresentados respectivamente nas Tabelas 6 e 7 do Apêndice.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados nas Tabelas 3 a 6 do presente tópico, conforme os distintos experimentos. A contagem nula é apresentada como  $N < 2,0$  ou seja, menos que 100 UFC/g (unidades formadoras de colônias/g). A estimativa do número de células viáveis por grama de conteúdo cecal foi transformada em  $\log_{10}$  e expressa, do mesmo modo, o número de organismos viáveis de *Salmonella* por grama de conteúdo cecal. A contagem de *Salmonella* seguiu o mesmo modelo adotado por BERCHIERI JÚNIOR e BARROW (1990).

### . Experimento 1:

TABELA 3. Contagem do número médio de bactérias nos cecos de aves desafiadas com *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, em rações tratadas com própolis.

Grupos	Nº Médio de Organismos <sup>2</sup>
1. Própolis em sol. hidroalcoólica <sup>1</sup>	8,24 (4,7 - 9,3)
2. Controle	8,69 (6,2 - 10,7)

<sup>1</sup> Própolis em sol. etanólica (60:40), diluída à 20% em água

<sup>2</sup> Número médio em  $\log_{10}$ , média de 16 aves, entre parênteses, valores mínimo e máximo de contagem.

. Experimento 2:

TABELA 4. Contagem do número médio de bactérias nos cecos de aves desafiadas com *Salmonella typhimurium* NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, em rações recebendo diferentes tratamentos.

Tratamento	Nº Médio de Organismos <sup>2</sup>
1. Própolis em sol. etanólica <sup>1</sup>	< 2,0
2. Álcool etílico	< 2,0
3. Controle	7,67 (3,38 - 9,64)

<sup>1</sup> Própolis comercial em solução etanólica (60:40) e, álcool etílico (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH), 90° GL, p.a.

<sup>2</sup> Número médio de organismos em log<sub>10</sub>, média de 10 aves, entre parênteses, valores mínimo e máximo de contagem.

. Experimento 3:

TABELA 5. Contagem do número médio de bactérias nos cecos de aves desafiadas com *Salmonella typhimurium* NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, em rações recebendo diferentes tratamentos.

Tratamento	Nº Médio de Organismos <sup>4</sup>
1. Própolis em sol. etanólica <sup>1</sup> (trat. 28 dias)	8,06 (8,04 - 9,59)
2. Álcool etílico <sup>2</sup> (trat. 28 dias)	8,60 (6,38 - 9,16)
3. Própolis em sol. etanólica <sup>1</sup> (trat. 14 dias)	8,86 (7,62 - 9,42)
4. Álcool etílico <sup>2</sup> (trat. 14 dias)	4,91 (3,11 - 9,15)
5. Própolis extrato seco <sup>3</sup> + água destilada esterilizada	9,05 (8,18 - 9,57)
6. Própolis extrato seco <sup>3</sup>	8,14 (6,0 - 9,40)
7. Controle	7,16 (5,11 - 8,99)

<sup>1</sup> Própolis comercial em solução etanólica (60:40);

<sup>2</sup> Álcool etílico (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) 90° GL, p.a., adicionados à ração 28 e 14 dias antes do fornecimento às aves;

<sup>3</sup> Própolis extrato seco: forma em pó sem álcool, adicionada 48 horas antes do consumo pelas aves;

<sup>4</sup> Número médio de organismos em log<sub>10</sub>, média de 10 aves, entre parênteses, valores mínimo e máximo de contagem.

## . Experimento 4:

TABELA 6 . Contagem do número médio de bactérias nos cecos de aves desafiadas com diferentes sorotipos<sup>1</sup> de *Salmonella* em rações tratadas com álcool etílico<sup>2</sup>.

Sorotipos Nal <sup>r</sup> -Spec <sup>r</sup>	Nº Médio de Organismos
<i>Salmonella agona</i>	7,71 (4,97 - 9,04)
Controle	8,72 (7,61 - 9,15)
<i>Salmonella infantis</i>	4,75 (4,18 - 8,85)
Controle	8,23 (5,52 - 9,18)
<i>Salmonella enteritidis</i>	< 2,0
Controle	4,13 (2,78 - 8,70)

<sup>1</sup> Sorotipos descritos, resistentes ao Ácido Nalidíxico e à Spectinomícina (Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>).

<sup>2</sup> Álcool etílico (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) 90°GL, p.a.

<sup>3</sup> Número médio de organismos em log<sub>10</sub>, média de 10 aves, entre parênteses, valores mínimo e máximo de contagem.

A proposta do estudo realizado tratou do emprego de substâncias que apresentassem ação antibacteriana na ração.

As substâncias ou produtos utilizados escolhidos para tal propósito foram a própolis e o álcool etílico que providos de ação antibacteriana conforme Revisão de Literatura, foram avaliados nos diferentes ensaios.

Como pode ser observado na Tabela 3, quando se diluiu a solução etanólica de própolis, em água destilada, as contagens acusaram a presença de *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>. Com esse resultado, optou-se por não se diluir a solução etanólica de própolis, trabalhando portanto, com o produto puro. Nas 48 horas subsequentes ao tratamento e posterior consumo pelas aves, as contagens demonstraram que não houve qualquer crescimento da bactéria nos cecos das aves.

Dentro do mesmo ensaio, testou-se o álcool etílico por ser o diluente utilizado na solução de própolis. Mais uma vez os resultados demonstraram que não houve crescimento da *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, dentro das mesmas 48 horas de tratamento da ração.

Baseados em resultados do 2º experimento, a ação antibacteriana da solução de própolis e do álcool foi avaliada no tempo. Assim, com um período de 14 dias e 28 dias anteriores ao consumo da ração pelas aves, aquela foi tratada com tais agentes de forma a se obter a resposta sobre o crescimento bacteriano.

As contagens não foram nulas, demonstrando que houve crescimento bacteriano quando as rações foram submetidas a esses tratamentos. Dentro do mesmo ensaio, porém, 48 horas antes do consumo pelas aves, as rações foram tratadas com própolis em pó, um extrato comercial obtido, sem a interferência do álcool como diluente. Da mesma forma, como pode ser observado na Tabela 5, as contagens demonstraram que em tais condições experimentais, os produtos avaliados não contiveram o crescimento bacteriano. À partir dos resultados obtidos sob as condições experimentais conduzidas passou-se à avaliação somente do álcool etílico, pois como se evidencia na Tabela 5, a própolis não inibiu o crescimento da *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>. Assim, no 4º experimento, avaliou-se a ação do álcool etílico sobre outros sorotipos de *Salmonella*, também resistentes ao Ác. Nalidíxico e à Spectinomicina.

Observa-se na Tabela 6 uma resposta não padronizada frente ao tratamento com o álcool etílico, conforme os distintos sorotipos inoculados nas rações sendo observado controle no crescimento apenas da *Salmonella enteritidis*. Pelos resultados demonstrados nas Tabelas 4 e 6, visualiza-se que ocorreu de fato, a eliminação total das salmonelas utilizando-se o álcool etílico como tratamento.

Baseados na revisão bibliográfica e nos dados aquilatados no presente estudo, pode-se afirmar que as rações utilizadas na alimentação das aves domésticas ainda se constituem em veículos importantes de *Salmonella* às aves e os atuais métodos de controle não permitem a eficácia completa na eliminação das mesmas.

Considerando a primeira semana de idade da ave como o período propício à colonização intestinal das aves às bactérias patogênicas, o presente estudo caracterizou os resultados particularmente nesse estágio de vida pois como relatado por DE LOACH (1989), a resistência à invasão bacteriana é menor na ave jovem. Uma vez controlada a infecção nesse estágio, minimizam-se as possibilidades do estabelecimento da enfermidade na ave adulta.

A utilização de outras dosagens do álcool etílico, diferentes tipos de álcoois e mesmo outros sorotipos de *Salmonella* são sugestões lançadas, tendo em vista os resultados alcançados no presente estudo.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

. Sob as condições experimentais conduzidas, o tratamento com a solução de própolis apresentou ação sobre a *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> somente quando em solução alcoólica, e dentro de um período de 48 horas de tratamento da ração anteriores ao consumo pelas aves, indicando que o efeito bactericida deveu-se ao álcool etílico presente na solução;

. Em relação aos demais sorotipos, o tratamento com o álcool etílico não demonstrou efetiva padronização em sua ação bactericida sendo observada a eliminação apenas de um dos sorotipos artificialmente inoculados na ração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.F. e SILVA, E.N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, **44**(2):105-20, 1992.
- ANDERSON, W.R.; MITCHELL, W.R.; BARNUN, D.A.; JULIAN, R.J. Practical aspects of competitive exclusion for the control of salmonella in turkeys. **Avian Diseases**, College Station, **28**(4):1071-8, 1984.
- ARAKAWA, A.; BABA, E.; FUKATA, T. *Eimeria tenella* infection enhances *Salmonella typhimurium* infection in chickens. **Poultry Science**, Menasha, **60**:2203-9, 1981.
- ARQUILLUE, C.P. e BENITO, M.F.J. **El propoleos de las abejas**. Madrid, Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1987. 11p. (Hojas Divulgadoras, 7).
- ASSUMPTO, L. Pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* em carnes e seus derivados, vendidos a retalho. **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, São Paulo, **11**(29):475-86, 1946.
- ÁVILA, F.A.; FERREIRA, M.D.; SILVA, E.N. *Salmonella* em carcaças de aves manipuladas nos abatedouros de Belo Horizonte. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**,

Belo Horizonte, 26(2):211-4, 1974.

BABA, S.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. Factors influencing enhanced *Salmonella typhimurium* infection in *Eimeria tenella* infected chickens. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, 46(7):1593-6, 1985.

BAILEY, J.S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, Menasha, 67:928-32, 1988.

BAILEY, J.S.; COX, N.A.; BLANKENSHIP, L.C. Persistence and spread of external *Salmonella* contamination during broiler production. **Poultry Science**, Menasha, 69:(Supl.1):154, 1990.

BANDELIN, F.J. Antibacterial and preservative properties of alcohols. **Cosmetics and Toiletries**, Oak Park, 92:59-70, May, 1977.

BARROW, P.A.; HASSAN, J.O.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Reduction in faecal excretion of *Salmonella typhimurium* strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S.typhimurium* organisms. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, 104:413-26, 1990.

BARROW, P.A.; LOVELL, M.A.; BERCHIERI JÚNIOR, A. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4. **Avian Pathology**, Belgrade, 20:681-92, 1991.

BARROW, P.A.; SIMPSON, J.M.; LOVELL, M.A. Intestinal colonization in the chicken by food poisoning *Salmonella* serotypes: microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, Belgrade, 17:571-88,

1988.

BERCHIERI JÚNIOR, A. e BARROW, P.A. Further studies on the inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella typhimurium* by pre-colonization with an avirulent mutant. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, **104**:427-41, 1990.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; PAULILLO, A.C.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K.; PESSOA, G.V.A. Sensibilidade a antimicrobianos por *Salmonella* isolados de farinhas de origem animal utilizados no preparo de rações. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, **16**(1):56-60, 1985.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T.; PAULILLO, A.C.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, **9**(1/2):9-12, 1989.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; ÁVILA, F.A.; PAULILLO, A.C.; SHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MARQUES, M.A.; MATSUDA, H.J. Pesquisa de salmonelas em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. **Científica**, Jaboticabal, **11**(2):165-8, 1983.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; IRINO, K.; NEME, S.N.; PAULILLO, A.C.; CALZADA, C.R.; FERREIRA, S.A.; PESSÔA, G.V.A. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, **4**(3):83-8, 1984.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; PAULILLO, A.C.; IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; ÁVILA, F.A.; PESSOA, G.V.A.;

- CALZADA, C.T. *Salmonella* em um abatedouro avícola. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, 3(1):81-7, 1987.
- BLEEM, A. Layer industry blamed, but helpless in controlling *Salmonella enteritidis*. **Feedstuffs**, Minneapolis, 63(42):1, 19-21, 1991.
- BORING, J.R. Domestic fish meal as a source of various *Salmonella* types. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, Bonner Springs, 53:311, 1958.
- BORLAND, E.D. *Salmonella* infection in poultry. **Veterinary Record**, London, 97:406, 1975.
- BOYD, L. A look back. In: SYMPOSIUM ON FEED QUALITY ASSURANCE - A SYSTEM WIDE APPROACH, Arlington, 1990. **Proceedings**. Arlington Center for Veterinary Medicine, Food e Drug Administration; U.S. Department of Health e Human Services, 1990. p.11-9.
- BOYER JÚNIOR, C.I.; NAROTSKY, S.; BRUNER, D.W.; BROWN, J.A. Salmonellosis in turkeys and chickens associated with contaminated feed. **Avian Diseases**, College Station, 6:43, 1962.
- BROW, R. Hive products: pollen, propolis and royal-jelly. **Bee World**, London, 70(3):109-17, 1989.
- BROWN, R.H. Pelleting does not result in *Salmonella* control. **Feedstuffs**, Minneapolis, 63(15):10, Apr. 1991.
- BROWNELL, J.R.; SADLER, W.W.; FANELLI, M.J. Factors influencing the intestinal infection of chickens with *Salmonella typhimurium*. **Avian Diseases**, College Station,

- 13:804-16, 1969.
- CESAR, M.A.A.; DELGADO, A.A.; OLIVEIRA, E.R.; NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.R. e VALSECCHI, O. **Elementos de tecnologia do álcool**; Curso de Tecnologia dos Produtos Agropecuários. Dep. de Tecnologia Rural - ESALQ-USP, Piracicaba, 1971, 61p.
- CHERNIAK, N.F. On synergistic effect of propolis and some antibacterial drugs. **Antibiotiki**, Moskva, **18(3):259-61**, 1973.
- CISMÁRIK, J. e MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis. I. Isolation and identification of the 3,4 dihydroxy cinnamic acid (caffeic acid) from propolis. **Experientia**, Basel, **26(4):713**, 1970.
- CISMÁRIK, L. e MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis. I. Isolation and identification of 4-hidroxy-3 methoxy-cinnamic acid (ferulic acid), from propolis. **Journal of Apicultural Research**, Lahore, **12(1):52-4**, 1973.
- CORRIER, D.E.; HINTON JÚNIOR, A.; KUBENA, L.F.; ZIPRIN, R.L.; DE LOACH, J.R. Decreased *Salmonella* colonization in turkey inoculated with anaerobic cecal microflora and provided dietary lactose. **Poultry Science**, Menasha, **70:1345-50**, 1991.
- CORRIER, D.E.; NISBET, D.J.; HOLLISTER, A.G.; SCANLAN, C. M.; HARGIS, B.M.; DE LOACH, J.R. Development of defined cultures of indigenous cecal bacteria to control salmonellosis in broiler chicks. **Poultry Science**, Menasha, **72:1164-68**, 1993.

- COX, N.A. e BAILEY, J.S. The role of the hatchery and hatchery environment in the colonization of baby chicks with salmonellae. *Poultry Science*, Menasha, 61(Supl. 1):178, 1989.
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BLANKENSHIP, L.C.; GILDERSLEEVE, R.F. *In ovo* administration of a competitive exclusion culture treatment to broiler embryos. *Poultry Science*, Menasha, 71:1781-4, 1992.
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; MAULDIN, J.M.; BLANKENSHIP, L.C. Presence and impact of salmonella contamination in commercial broiler hatcheries. *Poultry Science*, Menasha, 69:1606-9, 1990a.
- COX, N.A.; BURDICK, D.; BAILEY, J.S.; THOMSON, J.E. Effect of the steam conditioning and pelleting process on the microbiology and quality of commercial type poultry feeds. *Poultry Science*, Menasha, 65(4):704-9, 1986.
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; MAULDIN, J.M.; BLANKENSHIP, L.C.; WILSON, J.L. Extent of salmonella contamination in breeder hatcheries. *Poultry Science*, Menasha, 70:416-8, 1991.
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BLANKENSHIP, L.C.; MEINERSMANN, R.J.; STERN, N.J.; MCHAN, F. Fifty per cent colonization dose for *Salmonella typhimurium* administered orally and introcloacally to young broiler chicks. *Poultry Science*, Menasha, 69:1809-12, 1990b.
- COWDEN, J.M.; LYNCH, D.; JOSEPH, C.A.; O'MAHONEY, M.; MAWER, S.L.; ROWE, B.; BARTLETT, C.L.R. Case control study of infections with *Salmonella enteritidis* phage

type 4 in England. *British Medical Journal*, London, **299**:771-3, 1989a.

COWDEN, J.M.; CHISHON, D.; O'MAHONEY, M.; LYNCH, D.; MAWER, S.L.; SPAIN, G.E.; WARD, L.; ROWE, B. Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection associated with the consumption of fresh shell-egg products. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, **103**:47-52, 1989b.

COYLE, E.F.; PALMER, S.R.; RIBEIRO, C.D.; JONES, H.I.; HOWARD, A.J.; WARD, L.; ROWE, B. *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection association with hen's eggs. *Lancet*, London, **2**:1295-7, 1988.

CUNHA NETTO, S.J.; BRANDT, P.C.; PESSÔA, G.V.A. Sorotipos de *Salmonella* isolados de concentrado, cama e carcaças de frangos de corte em duas granjas em Goiânia-GO, 1974. *Arquivos da Escola Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, **34**(2):337-44, 1982.

DE LOACH, J.R. *Salmonella* prevention with carbohydrates. *Broiler Industry*, Sea Isle City, **52**(9):8-10, 1989.

DE LOACH, J.R.; OYOFO, B.A.; CORRIER, D.E.; KUBENA, L.F.; ZIPRIN, R.L.; NORMAN, J.O. Reduction of *Salmonella typhimurium* concentration in broiler chickens by milk or whey. *Avian Diseases*, College Station, **34**:389-92, 1990.



DUNCAN, M.S. e ADAMS, A.W. Effects of a chemical additive and of formaldeyde-gas fumigation on *Salmonella* in poultry feed. **Poultry Science**, Menasha, **51**:797-802, 1972.

EPPS, N.A. e IDZIAK, E.S. Poultry feed radication. 1. Microbiological aspect of poultry feed irradiation. **Poultry Science**, Menasha, **51**:277-82, 1972.

ERWIN, L.E. Examination of prepared poultry feeds for the presence of salmonella and other enteric organisms. **Poultry Science**, Menasha, **34**:215-6, 1955.

FRANK MCHAN, N.A.; COX, N.A.; BLANKENSHIP, L.C.; BAILEY, J.S. "In vitro" attackment of *Salmonella typhimurium* to chick ceca exposed to selected carbohydrates. **Avian Diseases**, College Station, **33**(2):340-4, 1989.

GIORGI, W.; CHASHI, K.; ARAÚJO, W.P. Farinha de carne e farinha de peixe como fontes de salmonelas para animais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, **38**(2):59-62, 1971.

GIRÃO, F.G.F.; OLIVEIRA, R.L.; FERREIRA, H.B.C.; NOGUEIRA, R.U.G. Isolamento de salmonela a partir de amostras de matérias-primas e rações e de materiais provenientes de

- aves. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA; CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 8., Camboriú, 1983. **Anais.** Camboriú, UBA, 1983. v.2, p.469-476.
- GIURGEA, R.; TOMA, V.; POPESCU, H.; POLINICENCU, C. Effects of standardized propolis extracts on certain blood constituents in chickens. **Clujul Medical**, Bucuresti, 54(2):151-4, 1981.
- GOREN, E.; JONG, W.A.; DOORNENBAL, F.; BOLDER, N.M.; MULDER, R.W.A.W.; JANSEN, A. Reduction of salmonella infection of broilers by spray application of intestinal microflora: a longitudinal study. **The Veterinary Quarterly**, Boston, 10(4):249-55, 1988.
- GRANGE, J.M. e DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, 83(3):159-60, 1990.
- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, London, 71(3):107-18, 1990.
- GRUMBLES, L.C. e FLOWERS, A.I. Epidemiology of paratyphoid infections in turkeys - Species encountered and possible sources of infection. **Journal of the American Veterinary**

**Medical Association, Ithaca, 138:261, 1961.**

GUBICZA, A. e MOLNAR, P. Propolis in the rearing of calves.  
**Magyar-Mezogazdasag, Budapest, 42(17):14, 1987.**

GUISALBERTI, E.L. Propolis. A Review. **Bee World, London, 60(2):59-84, 1979.**

HAIDAK, M.H. e PALMER, L.S. Vitamin E content of royal jelly and beebread. **Journal of Economic Entomology, Baltimore, 31(5):576-7, 1938.**

HALL, G. *Salmonella*: some straight talking. **International Hatchery Practice, North Humberside, 3(7):19-25, 1988.**

HASENSEN, L.B.; KAFTYREVA, L.; LASZLO, V.S.; WOITENKOVA, E.; NESTEROVA, M. Epidemiological and microbiological data on *Salmonella enteritidis*. **Acta Microbiologica Hungarica, Budapest, 39:31-9, 1992.**

HENDERSON, W.; OSTENDORF, JÚNIOR, J.; MOREHOUSE, L.G. The relative pathogenicity of some *Salmonella* serotypes for chicks. **Avian Diseases, College Station, 4:103-9, 1960.**

HINTON, M. e LINTON, A.H. Control of salmonella infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed.

**Veterinary Record**, London, **123**:416-21, 1988.

HINTON, M. e MEAD, G.C. Bacterial pathogens in animal feed and their control. **World's Poultry Science Journal**, London, **48**:72-3, 1992.

HOLLANDS, I.; MIYARES, C.; SIGARROA, A. Analises comparativo entre la acción del propoleo, la sulfoquinoxalina y la sulfometacina en conejos afectados por coccidiosis. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, Habana, **19**(2):99-104, 1988.

HOLLANDS, I.; MIYARES, C.; SIGARROA, A.; PEREZ, A. Acción del propoleo sobre la intensidad de parasitación en conejos afectados por eimerias intestinales. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, Habana, **15**(2):157-63, 1984.

HUGO, W.B. e RUSSELL, A.D. Types of antimicrobial agents. In: RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B. e AYLIFFE, G.A.J., ed. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization**, 29ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1992, cap.2, p.51-54.

HUME, M.E.; CORRIER, D.E.; AMBRUS, S.; HINTON JÚNIOR., A.; DE LOACH, J.R. Effectiveness of dietary propionic acid in controlling *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. **Avian Diseases**, College Station,

37(4):1051-6, 1993.

HUMPHREY, T.J.; LANNING, D.G. The vertical transmission of salmonellas and formic acid treatment of chicken feed. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, 100:43-9, 1988.

IBRAGIMOVA, A.I.; PANKRATOKA, N.V. Combined antimicrobial effect of propolis and antibiotics on pathogenic staphylococci. **Sbornik Nauchnykh Trudov Kazanskii Veterinarnyi Institute**, Kazan, 43-46, 1986. Apud **Apicultural Abstracts**, Cardiff, 39(1):87, 1988. Resumo.

ISRAELSEN, M.; JACOBSEN, E.E.; HANSEN, I.D. High product temperature key to salmonella control. **Feedstuffs**, Minneapolis, 66(9):31-4, 37, 1994.

IZAT, A.L.; HIERHOLZER, R.E.; KOPEK, J.M.; ADAMS, M.H.; REIBER, M.A.; MCGINNIS, J.P. Effects of D-Mannose on incidence and levels of salmonella in ceca and carcass samples of market age broilers. **Poultry Science**, Menasha, 69:2244-7, 1990a.

IZAT, A.L.; ADAMS, M.H.; CABEL, M.C.; COLBERG, M.; REIBER, M.A.; SKINNER, J.T.; WALDROUP, P.W. Effects of formic acid or calcium formate in feed on performance and microbiological characteristics of broilers. **Poultry Science**, Menasha, 69:1876-82, 1990b.

- JOHN, R.E.; CASTALDO, D.J.; SULIAMAN, S. Controlling salmonella - Focusing on the feedmill. **Feed International**, Mount Morris, 10(12):26-35, 1990.
- JONES, F.T. e HAGLER, W.M. Observations on new and reused litter for growing broilers. **Poultry Science**, Menasha, 62:175-9, 1983.
- KACZMAREK, F. e SNELA, M. Investigations on antioxidant properties of propolis. **Herba Polonica**, Poznan, 28(3/4): 153-7, 1982.
- KEDZIA, B. e HOLDERNA, E. Investigations on the combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus*. **Herba Polonica**, Poznan, 32(3/4):187-95, 1986.
- KIVALINA, V.P. e GORSHUNOVA, V.P. Combined effect of antibiotics and propolis. **Antibiotiki**, Moscow, 18(3):261-3, 1973.
- KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; GABRYS, J.; GRABIEC, S.; SHANI, J. Antioxidant properties of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. **Biochemistry International**, Sydney, 21(4):593-7, 1990.

- LAVIE, P. Les substances antibactériennes dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifera*, L.). **Annales de L'Abeille**, Paris, **3**:103-83, 201-305, 1960.
- LILLARD, H.S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, Ames, **53**(3):202-4, 1990.
- LINDENFELSER, L.A. Antimicrobial activity of propolis. **American Bee Journal**, Hamilton, **107**(3):90-2, 130-1, 1967.
- LINTON, A.H.; AL CHALABY, Z.A.M.; HINTON, M.H. Natural subclinical salmonella infection in chickens: a potential model for testing the effects of various procedures on salmonella shedding. **Veterinary Record**, London, **116**(14):361-4, 1985.
- LIU, T.S.; SNOEYENBOS, G.H.; CARLSON, V.L. Thermal resistance of *Salmonella senftenberg* 775W in dry animal feeds. **Avian Diseases**, College Station, **13**:611-31, 1969.
- LORI, G.A. Acción fungicida del propoleos en la dermatomycosis bovina. **Industria Apicola**, **1**(1):38-43, 1990. Apud. **Apicultural Abstract**, Cardiff, **44**(4):373, 1993. (Resumo).

LYNN, B. Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. In: HUGO, W.B. e RUSSELL, A.D. **Pharmaceutical Microbiology**. 3<sup>ed</sup>. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1983. cap.10, p.201-236.

LYN, F.Y.; MORRIS JÚNIOR, J.G.; TRUMP, D.; TILGHMAN, D.; WOOD, P.K.; JACKMAN, N.; ISRAEL, E.; LIBONATI, J.P. Investigation of an outbreak of *Salmonella enteritidis* gastroenteritis associated with consumption of eggs in a restaurant chain in Maryland. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, 128:839-44, 1988.

MCLLROY, S.G.; MCCRACKEN, R.M.; NEILL, S.D.; O'BRIEN, J.J. Control prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks. **Veterinary Record**, London, 125(22):545-8, 1989.

MEAD, G.C. e BARROW, P.A. Salmonella control in poultry by "competitive exclusion" or immunization. **Letters in Applied Microbiology**, London, 10:221-7, 1990.

MERESTA, L. e MERESTA, T. Effect of pH on bactericidal activity of propolis. **Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy**, Pulawy, 24(1/4):21-5, 1980.



- MERESTA, L. e MERESTA, T. Usefulness of various solvents for extracting biologically active substances from propolis. **Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy, Pulawy, 25(1/4):12-4, 1982.**
- MERESTA, L. e MERESTA, T. Research *in vitro* antibacterial activity of propolis extracts. **Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy, Pulawy, 26(1/4):77-80, 1983.**
- MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using an extract of propolis. **Medycyna Weterynaryjna, Warszawa, 45(7):392-5, 1989.**
- METZNER, J.; BEKEMEIER, H.; SCHNEIDEWIND, E.; SCHWAIBERGER, R. Bioautographische erfassung der antimikrobiell wirksamen inhaltstoffe von Propolis. **Pharmazie, Wheinhein, 30(12):799-800, 1975.**
- MILES, R.D. e BUTCHER, G.D. Salmonella, controlling it in the broiler, egg industries. **Feedstuffs, Minneapolis, 65(42):23-45, 1993.**
- MILLET, J.C.; MICHEL, D.; SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P. étude preliminaire des proprietés fongistatiques de la propolis comparées a celles de quelques produits commerciaux. **Plantes Medicinales et Phytotherapie, Angers, 21(1):3-7,**

1987.

MILNER, K.C. e SCHAFFER, M.F. Bacteriologic studies of experimental salmonellae infections in chicks. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, 90:81-6, 1952.

MIRANDA, J.B.N.; PESSÔA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T. Ocorrência de *Salmonella* em farinhas utilizadas como matéria-prima na composição de rações de animais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 38(2):157-60, 1978.

MIYARES, C.; HOLLANDS, I.; CASTANEDA, C.; GONZALES, T. Therapeutic trial with the propolis-based product (Propolisina) in human giardiasis. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, Buenos Aires, 18(3):195-202, 1988.

MORAN JÚNIOR, E.T. e BILGILI, S.F. Cecal salmonellae: influence of feed and water access on luminal entry with broilers challenged at market age. **Poultry Science**, Menasha, 68(Supl.1):40, 1989.

MOREHOUSE, L.G. e WEDMAN, E.E. Salmonella and other disease producing organisms in animal by-products - a survey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, 139(9):989-95, 1961.

- MORISHIMA, H.E.; BABA, E.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. Effect of *Eimeria tenella* infection in chickens fed the feed artificially contaminated with *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, Menasha, **63**:1732-7, 1984.
- MORISHITA, Y.; FULLER, R.; COATES, M.E. Influence of dietary lactose on the gut flora of chicks. *British Poultry Science*, Menasha, **23**:349-59, 1982.
- MORRIS, G.K. *Salmonella enteritidis* and eggs: assessment of risk. *Poultry Science*, Menasha, **68**(supl. 1):100, 1989.
- MORRISON, R.M.; ROBERTS, T.; WITUCKI, L. Irradiation of U.S. Poultry. Benefits, costs and Export Potencial. *Broiler Industry*, Sea Isle City, **56**(6):20-30, 1993.
- MORRONDO, R.M. *Salmonellosis*. Madrid, Ministerio de Agricultura, Pesca Y Alimentación, 1992. 26p.(Hojas Divulgadoras, 5).
- MULLER, J. Bacteriologic examination of imported meat and bone meal and the like. *Nordiski Veterinaermedicin*, Kobenhavn, **4**:290, 1952.

NURMI, E. e RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*, London, **241**(19):210-1, 1973.

OBREGON, A.M.F. e ROJAS, H.N.M. Acción antimicrobiana de los extratos alcoholicos de propoleo. *Revista Cubana de Farmacia*, Habana, **24**(1):34-44, 1990.

O'BRIEN, J.D.P. Aspects of *Salmonella enteritidis* control in poultry. *World's Poultry Science Journal*, London, **46**:119-24, 1990.

OKONENKO, L.B. *Salmonella* infections and propolis. *Zdravookhr.Kaz*, Alma-Ata, (1):55-7, 1988. Apud *Apicultural Abstract*, Cardiff, **42**(2):175, 1991. (Resumos).

OYOFO, B.A.; DROLESKEY, R.E.; NORMAN, J.O.; MOLLENHAVER, H. H.; ZIPRIN, R.L.; CORRIER, D.E.; DE LOACH, J.R. Inhibition by mannose of *in vitro* colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, Menasha, **68**:1351-6, 1989a.

OYOFO, B.A.; DE LOACH, J.R.; CORRIER, D.E.; NORMAN, J.O.; ZIPRIN, R.L.; MOLLENHAUER, H.H. Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chi-

ckens. **Avian Diseases**, College Station, **33**:531-4, 1989b.

PERALES, I. e AUDICANA, A. The role of hens eggs in outbreaks of salmonellosis in North Spain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, **8**:175-80, 1989.

PESTANA, B.R. e RUGAI, E. O porco normal como portador de salmonelas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, **3**(2):232-5, 1943.

PESTANA, B.R. e RUGAI, Z. Da presença de salmonelas nas carnes preparadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, **7**(único):5-7, 1947.

PRADO FILHO, L.G.; AZEVEDO, J.L.; FLECHTMANN, C.H.W. Antimicrobianos em própolis de *Apis mellifera* L. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, **20**(único):399-403, 1962.

PUTKAMMER, Z. Própolis, como produzir, coletar e armazenar. **Apicultura no Brasil**, Florianópolis, **4**(24):24-7, 1988.

QUADRI, S.F. e DEYOE, C.W. Effects of temperature and pelleting on salmonella content of feeds. **Feedstuffs**, Minneapolis, **47**(17):65, 1975.

QUESADA, A.; IZZI, R.; MAGGIO, V. Sulla presenza di germi del genere *salmonella* nelle farine di pesce impiegate per la confezione dei mangini. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, Faenza, **14**:757, 1960.

RASMUSSEN, O.G.; HANSEN, R.; JACOBS, N.J.; WILDER, O.H.M. Dry heat resistance of salmonellas in rendered animal by-products. **Poultry Science**, Menasha, **43**:1151, 1964.

ROJAS, H.N.M. e CUETARA, B.K. Efecto antibiotico del propoleo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clinico humano. **Revista Cubana de Farmacia**, Habana, **24**(1):45-50, 1990.

RYBAK, H.C. e SZCZESNA, T. Effect of various solvents on the biological activity of propolis. **Pszczelnicze Zeszyty Naukowe**, Pulawy, **35**:55-62, 1991.

SADLER, W.W.; BROWNELL, J.R.; FANELLI, M.J. Influence of age and inoculum level on shed pattern of *Salmonella typhimurium* in chicks. **Avian Diseases**, College Station, **13**:793-8, 1969.

SHELLER, S.; TUSTANOWSKI, J.; KURILO, B.; PARADOWSKI, Z.; OBUSZKO, Z. Biological properties of propolis. **Arzneimittel-Forschung**, Aulendorf, **27**(4):889-90, 1977.

SCHLEIFER, J.H. A review of the efficacy and mechanism of competitive exclusion for the control of *Salmonella* in poultry. **World's Poultry Science Journal**, London, **41(1):72-83**, 1985.

SCHLEIFER, J.H.; JUWEN, B.J.; BEARD, C.W.; COX, N.A. The susceptibility of chicks to *Salmonella montevideo* in artificially contaminated poultry feed. **Avian Diseases**, College Station, **28:497-503**, 1984.

SCHNEITZ, C. e NUOTIO, L. Efficacy of different microbial preparation, for controlling salmonella colonization in chicks and turkeys poults by competitive exclusion. **British Poultry Science**, Huntingdon, **33:207-11**, 1992.

SILVA, E.N.; HIPÓLITO, O.; SANTOS, D.S. Resistência à drogas em amostras de salmonelas isolados de galinhas e perús reprodutores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, **4(4):143-5**, 1984.

SILVA, E.N.; OLIVEIRA, R.L.; REIS, R.; AVILA, F.A. Salmonelas em farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações. **Arquivos da Escola Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, **25(2):169-73**, 1973.

SMITH, H.W. The development of the flora of the alimentary

tract in young animals. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, **90**:495, 1965.

SNOEYENBOS, G.H. An approach to identifying and mantaining salmonella-free chickens. **Avian Diseases**, College Station, **15**:28-30, 1971.

SNOEYENBOS, G.H.; WEINACK, O.M.; SOERJADI-LIEM, A.S.; MILLER, B.M.; WOODWAD, D.E.; WESTON, C.R. Large scale trials to study competitive exclusion of salmonella in chickens. **Avian Diseases**, College Station, **29**(4):1004-11, 1985.

SOERJADI-LIEM, A.S.; CUMMING, R.B. Studies on the incidence of salmonellae carriers in broiler flocks entering a poultry processing plant in Australia. **Poultry Science**, Menasha, **63**(5):892-5, 1984.

ST. LOUIS, M.E.; MORSE, D.L.; POTTER, M.E.; DEMELF, T.M.; GUZEWICH, J.J.; TAUXE, R.V.; BLAKE, P.A. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New implications for the control of salmonellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, **259**:2103-7, 1988.



- STEPHENS, J.F. e VESTAL, O.H. Effects of intestinal coccidiosis upon the course of *Salmonella typhimurium* infection in chickens. *Poultry Science*, Menasha, **45**:446-50, 1966.
- STEPHENS, J.F.; BARNETT, B.D.; HOLTMAN, D.F. Concurrent *Salmonella typhimurium* and *Eimeria necatrix* infections in chicks. *Poultry Science*, Menasha, **43**:351-6, 1964.
- STEVENS, A.; JOSEPH, C.; BRUCE, J.; FENTON, D.; O'MAHONY, M.; CUNNINGHAM, D.; O'CONNOR, B.; ROWE, B. A large outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 4 associated with eggs from overseas. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, **103**:425-33, 1989.
- STICKLER, D.J.; KING, J.B. Bacterial sensitivity and resistance-A-intrinsic resistance. In: RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B. e AYLIFFE, G.A.J.; ed. *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, 2ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1992, cap.2, p.51-54.
- TAUNAY, A.E. Dianóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, **28**:43-69, 1968.

TELLEZ, G.; DEAN, C.E.; CORRIER, D.E.; DE LOACH, J.R.; JAEGER, L.; HARGIS, B.M. Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids and *Salmonella enteritidis* organ invasion in Leghorn chicks. **Poultry Science**, Menasha, 72:636-42, 1993.

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A.M.; ASEM, E.K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. **Poultry Science**, Menasha, 73(1):89-98, 1994.

THRELFALL, E.J. Antibiotics and the selection of food-borne pathogens. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, London, 73:965-102-S, 1992.

TORRES, D.; HOLLANDS, I.; PALACIOS, E. Efecto de um extrac-to alcohólico de propoleos sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* in vitro. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, Habana, 21(1):15-20, 1990.

TOTH, G. Propolis: Medicine or fraud ? **American Bee Journal**, Hamilton, 125(5):337-8, 1985.

TURNBULL, P.C. e SNOEYENBOS, G.H. The roles of ammonia water activity, and pH in the salmonellocidal effect of long-used poultry litter. **Avian Diseases**, College Station, 17:72-86, 1973.

- VALDES, G.; RUIZ, M.; MARTIN, M. Antibacterial characterization of propolis from Madruga and Mariel municipalities in the Province of Havana. **Ciencia y Técnica en la Agricultura-Apicultura**, Habana, 5:25-37, 1989.
- VANDERWAL, P. Salmonella control of feedstuffs by pelleting or acid treatment. **World's Poultry Science Journal**, London, 35(2):70-8, 1979.
- VAUGHN, J.B.; WILLIAMS JÚNIOR, L.F.; LE BLANC, D.R.; HELDSON, H.L.; TAYLOR, C. Salmonella in a modern broiler operation: A longitudinal study. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, 35(5):737-41, 1974.
- VERÍSSIMO, M.T.L. Os pigmentos presentes na própolis. **Apicultura no Brasil**, Florianópolis, 5(30):33, 1989.
- VILLANUEVA, V.R.; BARBIER, M.; GONNET, M.; LAVIE, P. Les flavonoides de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine. **Annales de L'Institut Pasteur**, Amsterdam, 118(1):84-7, 1970.
- WALDROUP, A.L.; SKINNER, J.T.; HIERHOLZER, R.E.; WALDROUP, F.W. An evaluation of fructooligosacharide in diets for broiler chickens and effects on salmonellae contamination of carcasses. **Poultry Science**, Menasha, 72:643-50, 1993.

WALDROUP, A.L.; YAMAGUCHI, W.; SKINNER, J.T.; WALDROUP, P.W. Effects of dietary lactose on incidence and levels of salmonellae on carcasses of broiler chickens grown to market age. *Poultry Science*, Menasha, **71**:288-95, 1992.

WALKER, P. e CRANE, E. Constituents of propolis. *Apidologie*, Paris, **18**(4):327-34, 1987.

WEINACK, O.M.; SNOEYENBOS, G.H.; SOERJADI-LIEM, A.S.; SMYSER, C.F. Influence of temperature, social and dietary stress on development and stability of protective microflora in chickens against *S.typhimurium*. *Avian Diseases*, College Station, **29**:1177-83, 1985.

WESTERFELD, B.L.; ADAMS, A.W.; ERWIN, L.E.; DEYOE, C.W. Effect of a chemical additive on *Salmonella* in poultry feed and host birds. *Poultry Science*, Menasha, **49**:1319-23, 1970.

WILLIAMS, J.E. Avian Salmonellosis. In: HOFSTAD, M.S.; CALNEK, B.W.; HELMBOLDT, C.F.; REID, W.M.; YODER JUNIOR, H.W., ed. *Diseases of poultry*, 6.ed. Ames, The Iowa State University Press, 1972. cap. 3, p.81-2.

WILLIAMS, J.E. *Salmonella* in poultry feeds. A worldwide review. *World's Poultry Science Journal*, London, **37**:6-

25, 1981.

WILLIAMS JÚNIOR, L.F.; VAUGHN, J.B.; BLANTON, V. A ten month study of salmonella contamination in animal protein meals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, 155(2):167-74, 1969.

ZINDEL, H.C. e BENNETT, M.V. Salmonellae in poultry feeds. **Poultry Science**, Menasha, 47:1025-8, 1968.

ZIPRIN, R.L.; CORRIER, D.E.; HINTON JÚNIOR, A.; BEIER, R.C.; SPATES, G.E.; DE LOACH, J.R.; ELISSALDE, M.H. Intracloacal *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickens: reduction of colonization with anaerobic organisms and dietary lactose. **Avian Diseases**, College Station, 34:749-53, 1990.

ZIPRIN, R.L.; ELISSALDE, M.H.; HINTON JÚNIOR, A.; BEIER, R.C.; SPATES, G.E.; CORRIER, D.E.; BENOIT, T.G.; DE LOACH, J.R. Colonization control of lactose - fermenting *Salmonella typhimurium* in young broiler chickens by use of dietary lactose. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, 52(6):833-7, 1991.

## APÉNDICE

**TABELA 1.** Efeito do tratamento da ração com própolis em solução hidroalcoólica sobre o número de *Salmonella typhimurium*<sup>1</sup> no conteúdo cecal das aves. (EXP.1)

Ave nº	Grupos <sup>2</sup>	
	1	2
1	7,0 x 10 <sup>8</sup>	1,5 x 10 <sup>7</sup>
2	2,4 x 10 <sup>8</sup>	5,25 x 10 <sup>10</sup>
3	1,09 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
4	1,2 x 10 <sup>7</sup>	4,95 x 10 <sup>6</sup>
5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,41 x 10 <sup>8</sup>
6	5,4 x 10 <sup>4</sup>	1,65 x 10 <sup>8</sup>
7	6,6 x 10 <sup>6</sup>	1,65 x 10 <sup>6</sup>
8	4,05 x 10 <sup>8</sup>	1,05 x 10 <sup>6</sup>
9	7,95 x 10 <sup>8</sup>	6,6 x 10 <sup>8</sup>
10	4,2 x 10 <sup>8</sup>	3,6 x 10 <sup>8</sup>
11	1,13 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
12	2,43 x 10 <sup>7</sup>	1,42 x 10 <sup>7</sup>
13	4,35 x 10 <sup>7</sup>	7,8 x 10 <sup>7</sup>
14	3,0 x 10 <sup>8</sup>	7,35 x 10 <sup>7</sup>
15	2,4 x 10 <sup>8</sup>	2,4 x 10 <sup>7</sup>
16	1,95 x 10 <sup>8</sup>	1,31 x 10 <sup>7</sup>

<sup>1</sup> nº de organismos de *S.typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup>, em UFC/g.

<sup>2</sup> Grupos:

1 - Ração com própolis (sol. hidroalcoólica) + STM F98;

2 - Controle (Ração + STM F98);

**TABELA 2.** Efeito do tratamento da ração com própolis em solução hidroalcoólica sobre o número de *Salmonella typhimurium* no conteúdo cecal das aves<sup>1</sup>. (EXP.1)

Ave nº	Grupos <sup>2</sup>	
	1	2
1	8,8	9,2
2	8,3	10,7
3	9,0	9,1
4	9,0	6,7
5	9,0	8,1
6	4,7	8,2
7	6,8	6,2
8	8,6	9,0
9	8,9	8,8
10	8,6	8,5
11	8,0	9,1
12	9,3	9,1
13	7,6	9,9
14	8,5	7,9
15	8,4	9,4
16	8,3	9,1
Média	8,24	8,69

<sup>1</sup> contagem apresentada na Tabela 1, transformados em  $\log_{10}$  de *Salmonella typhimurium* por grama de conteúdo cecal

<sup>2</sup> Grupos indicados na Tabela 1.



**TABELA 3.** Número de organismos STM F98 Nalr-Specr, no conteúdo cecal das aves de corte que consumiram ração não tratada (controle). (EXP.2)

Ave nº	UFC/g	log <sub>10</sub>
1	1,9 × 10 <sup>7</sup>	7,28
2	3,0 × 10 <sup>6</sup>	6,48
3	4,4 × 10 <sup>9</sup>	9,64
4	1,47 × 10 <sup>9</sup>	9,17
5	8,7 × 10 <sup>8</sup>	5,94
6	5,4 × 10 <sup>8</sup>	8,73
7	7,2 × 10 <sup>8</sup>	8,86
8	10,8 × 10 <sup>7</sup>	8,03
9	2,4 × 10 <sup>3</sup>	3,38
10	1,5 × 10 <sup>9</sup>	9,18
Média		7,67

**TABELA 4.** Efeito do tratamento<sup>1</sup> da ração sobre o nº de *Salmonella typhimurium* NaI<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> no conteúdo cecal das aves. (EXP.3)

Ave nº	Grupos <sup>2</sup>						
	1	2	3	4	5	6	7
1	8,5 x 10 <sup>6</sup>	9,8 x 10 <sup>6</sup>	6,5 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	1,22 x 10 <sup>7</sup>	2,4 x 10 <sup>6</sup>	2,9 x 10 <sup>6</sup>
2	5,9 x 10 <sup>6</sup>	9,3 x 10 <sup>6</sup>	2,64 x 10 <sup>7</sup>	5,6 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	4,13 x 10 <sup>6</sup>	2,2 x 10 <sup>6</sup>
3	3,9 x 10 <sup>7</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	1,49 x 10 <sup>7</sup>	1,42 x 10 <sup>7</sup>	9,5 x 10 <sup>6</sup>	1,02 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>
4	6,3 x 10 <sup>6</sup>	2,4 x 10 <sup>6</sup>	4,2 x 10 <sup>7</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	3,7 x 10 <sup>7</sup>	1,8 x 10 <sup>6</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>
5	1,1 x 10 <sup>6</sup>	3,2 x 10 <sup>6</sup>	6,8 x 10 <sup>6</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1,87 x 10 <sup>7</sup>	1,16 x 10 <sup>7</sup>	5,1 x 10 <sup>6</sup>
6	1,55 x 10 <sup>7</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	7,7 x 10 <sup>6</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>	1,9 x 10 <sup>7</sup>	2,2 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>5</sup>
7	n	1,46 x 10 <sup>7</sup>	9,8 x 10 <sup>6</sup>	n	1,58 x 10 <sup>7</sup>	2,54 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>6</sup>
8	2,9 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	1,12 x 10 <sup>7</sup>	2,6 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>7</sup>	3,5 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>
9	3,83 x 10 <sup>7</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	5,46 x 10 <sup>6</sup>	1,6 x 10 <sup>6</sup>	1,5 x 10 <sup>6</sup>	1,24 x 10 <sup>7</sup>	6,0 x 10 <sup>6</sup>
10	1,66 x 10 <sup>7</sup>	1,38 x 10 <sup>7</sup>	1,12 x 10 <sup>7</sup>	n	4,65 x 10 <sup>6</sup>	5,0 x 10 <sup>7</sup>	9,7 x 10 <sup>6</sup>

- <sup>1</sup> GRUPOS: (28 dias): 1 = própolis (sol. alcoólica), 40%, 20 ml/kg de ração;  
 2 = álcool (etanol), 20 ml/kg de ração;  
 (14 dias): 3 = própolis (sol. alcoólica), 40%, 20 ml/kg de ração;  
 4 = álcool (etanol), 20 ml/kg de ração  
 (48 horas): 5 = Frópolis extrato seco e água destilada esterilizada (q.s.p.), 20 ml/kg;  
 6 = Frópolis extrato seco, 10 g/kg  
 7 = Controle  
 n = não houve crescimento.

**TABELA 5.** Efeito do tratamento da ração sobre o nº de *Salmonella typhimurium* Nal<sup>r</sup>-Spec<sup>r</sup> no conteúdo cecal das aves<sup>2</sup>. (EXP.3)

Ave nº	Grupos <sup>1</sup>						
	1	2	3	4	5	6	7
1	8,93	8,99	8,81	5,04	9,09	6,38	6,46
2	8,77	8,97	9,42	8,75	8,95	8,62	8,34
3	9,59	8,95	9,17	9,15	8,98	6,0	6,0
4	8,80	6,38	7,62	5,18	9,57	8,26	5,28
5	8,04	8,51	8,83	5,26	9,27	9,06	8,71
6	9,19	8,90	8,89	3,11	9,28	9,34	5,45
7	n	9,16	8,99	n	9,20	9,40	8,45
8	8,46	8,08	9,05	8,41	9,30	7,54	5,11
9	9,58	8,95	8,74	4,20	8,18	9,09	8,78
10	9,22	9,14	9,05	n	8,67	7,70	8,99
Média	8,06	8,60	8,86	4,91	9,05	8,14	7,16

<sup>1</sup> GRUPOS: Grupos descritos na Tabela 4.

<sup>2</sup> Contagem apresentada na Tabela 4, dados transformados em  $\log_{10}$  de *Salmonella typhimurium* por grama de conteúdo cecal.

n → não houve crescimento.

**TABELA 6.** Contagem do número de bactérias do conteúdo cecal de aves que consumiram rações dos diferentes tratamentos. (EXP.4)

Ave nº	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
1	$9,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^9$	n	$1,2 \times 10^8$	n	$5,1 \times 10^8$
2	$2,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	n	$3,3 \times 10^8$	n	n
3	$8,3 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^8$	n	$3,7 \times 10^3$
4	$1,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$	$3,7 \times 10^8$	n	$6,0 \times 10^2$
5	$2,2 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$7,0 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	n	$2,0 \times 10^3$
6	$3,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$
7	$5,4 \times 10^6$	$9,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	n	$6,0 \times 10^2$
8	$7,2 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^8$	n	$2,3 \times 10^3$
9	$6,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	n	$2,8 \times 10^8$
10	$3,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$7,4 \times 10^8$	n	n

<sup>1</sup> Tratamentos

- 1 = Ração com *S.agona* + álcool etílico (2%)
- 2 = Ração com *S.agona* (controle)
- 3 = Ração com *S.infantis* + álcool etílico (2%)
- 4 = Ração com *S.infantis* (controle)
- 5 = Ração com *S.enteritidis* + álcool etílico (2%)
- 6 = Ração com *S.enteritidis* (controle)
- n = Não houve crescimento.

**TABELA 7.** Contagem do número de bactérias<sup>1</sup> do conteúdo cecal de aves que consumiram rações sob diferentes tratamentos<sup>2</sup>. (EXP.4)

Ave nº	Grupos <sup>1</sup>					
	1	2	3	4	5	6
1	4,97	9,15	n	8,08	n	8,70
2	8,38	8,26	n	5,52	n	n
3	8,92	8,28	6,30	8,52	n	3,57
4	9,04	9,00	6,23	8,57	n	2,78
5	7,34	7,61	8,85	8,79	n	3,30
6	8,54	9,08	4,49	8,30	7,61	8,38
7	6,74	8,97	5,30	8,04	n	2,78
8	8,86	8,80	4,18	8,43	n	3,36
9	6,82	9,00	5,58	9,18	n	8,45
10	7,52	9,00	6,57	8,87	n	n
Média	7,71	8,72	4,75	8,23	n	4,13

<sup>1</sup> Contagem apresentada na Tabela 6, dados transformados em  $\log_{10}$  de *Salmonella typhimurium* por grama de conteúdo cecal.

<sup>2</sup> Tratamentos indicados na Tabela 6.

n = não houve crescimento