

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**ADITIVOS ALTERNATIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE
CORTE**

CAROLINE OLIVEIRA MENDES

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO - 2015**

ADITIVOS ALTERNATIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

CAROLINE OLIVEIRA MENDES

Médica Veterinária

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Duarte Abreu

Co-Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

AGOSTO - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

M538a	<p>Mendes, Caroline Oliveira. Aditivos alternativos na alimentação de frangos de corte / Caroline Oliveira Mendes._ Cruz das Almas, BA, 2015. 78f.; il.</p> <p>Orientador: Ricardo Duarte Abreu. Coorientador: Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Frango de corte – Alimentos. 2.Frango de corte – Alimentação e ração. 3.Nutrição animal – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.513</p>
-------	--

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
CAROLINE OLIVEIRA MENDES
APROVAÇÃO**

Prof. Dr. Ricardo Duarte Abreu
(Orientador - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

Prof. Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati
(Universidade Federal da Bahia)

Prof^a. Dra. Lia Muniz Barretto Fernandes
(Universidade Federal da Bahia)

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO - 2015**

"A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos, mesmo quando todos dizem que ele é impossível."

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar; sempre iluminando os meus caminhos, me dando força e sabedoria para enfrentar as dificuldades dessa caminhada, permitindo que eu chegasse até aqui e realizasse esse grande sonho;

À minha família, que me dá força e carinho para continuar sempre no caminho do bem em toda minha vida;

Ao meu marido, Fábio Martins, pelo seu amor e por estar sempre ao meu lado nas horas que mais precisei;

Ao Prof. Ricardo Duarte Abreu, pela orientação, amizade, paciência, ensinamentos, dedicação e confiança durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito pela co-orientação, pelos ensinamentos;

Ao Prof. Carlos Eduardo pela importante orientação na interpretação estatística dos resultados desse experimento;

Aos meus amigos, em especial Júlia, Naiara, Crisane, Lennon, Debora, Jamile, Anselmo, Haiala, Jaqueline, Rafael e Jeane pela amizade que construímos, pela grande dedicação e preciosa colaboração durante toda a execução dos experimentos;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho;

À DSM Produtos Nutricionais do Brasil Ltda, pelo financiamento do projeto de pesquisa;

Aos seguranças do setor de avicultura;

À empresa Avigro Avícola Agroindustrial Ltda, pela ajuda no fornecimento das aves e ingredientes para a ração;

À empresa Gujão, pela ajuda no fornecimento da cama aviária reutilizada;

Ao LASAB, laboratório de Sanidade Avícola da Bahia, pelo apoio nas análises microbiológicas, em especial a Lia Fernandes, Rebeca e Wellington;

À Priscila Rocha, pelo apoio nas ideias e contribuição nas análises morfométricas.

Ao Prof. e amigo Victor Diógenes pelo apoio durante todo processo de construção dessa dissertação.

À amiga Anilma Cardoso pelo apoio nas boas ideias e formatações dessa dissertação.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
Capítulo 1	vi
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Sistema digestório das aves.....	9
2.2 Microbiota intestinal de frango de corte.....	11
2.3 Aditivos destinados à alimentação animal.....	13
2.3.1 Antibióticos.....	15
2.3.2 Probióticos.....	18
2.3.3 Ácidos Orgânicos.....	22
2.3.4 Óleos essenciais.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5 CONCLUSÃO.....	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

DESEMPENHO, MORFOMETRIA E CONTAGEM BACTERIANA INTESTINAL DE
FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES ADITIVOS
ALTERNATIVOS MELHORADORES DE DESEMPENHO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4 CONCLUSÃO.....	70
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO 1**

Página

- Figura 1. As bactérias patogênicas e não patogênicas geralmente competem por nutrientes. As não patogênicas têm maior poder de competição, colonizando melhor o intestino..... 20
- Figura 2. As bactérias não patogênicas atuam como antígeno potencializando a resposta imunológica no hospedeiro. Os patógenos são repelidos pelos receptores das células epiteliais..... 20
- Figura 3. Efeitos das bactérias não patogênicas no trato intestinal..... 20

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição centesimal e níveis calculados de nutrientes das dietas basais para as fases de 1 a 7 dias, de 8 a 21 dias, de 22 a 34 dias e 35 a 41 dias de idade.....	59
Tabela 2. Ganho de peso médio, consumo de ração médio, conversão alimentar e mortalidade nos intervalos: 01-21, 22-41 e 01-41 sob os diferentes tratamentos experimentais.....	62
Tabela 3. Altura da vilosidade, profundidade da cripta, área absorção nas coletas 7, 27 e 41 dias sob os diferentes tratamentos experimentais.....	66
Tabela 4. Variação da Contagem Bacteriana Total (logCBT) em resposta a diferentes tratamentos e idades de coletas.....	67

Aditivos alternativos na alimentação de frangos de corte.

Autora: Caroline Oliveira Mendes

Orientador: Dr. Ricardo Duarte Abreu

RESUMO: O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com diferentes aditivos compostos por uma combinação de óleos essenciais associados ao ácido benzoico e probióticos como alternativas aos melhoradores de desempenho em dieta para frangos de corte, sobre as características de desempenho (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade), morfometria intestinal e contagem bacteriana total das cepas de *Escherichia coli*. Foram utilizados 1.632 pintos de corte machos da linhagem Cobb500, de um dia de idade, num delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por 6 tratamentos e 8 repetições, com 34 aves por unidade experimental. O período experimental de 41 dias foi subdividido em quatro fases de avaliação: aos 7, 21, 35 e 41 dias. Os tratamentos utilizados foram: dieta basal sem aditivos (controle negativo-CN); dieta basal suplementada com óleos essenciais (timol, eugenol e piperina) e ácido benzoico (CPP); dieta basal com probióticos (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) (PRO), dieta basal com CPP + PRO; dieta basal com Enramicina 8% (controle positivo –CP); dieta basal com CP + CPP. Para as variáveis consumo de ração e mortalidade não foram observados efeitos dos tratamentos durante todo o período experimental. Para a conversão alimentar não encontrou-se efeito dos tratamentos no período de 1 a 41 dias de idade, porém, no período de 1 a 21 dias, os tratamentos CPP, CPP+PRO e CP diferiram do CN. Para o ganho de peso observou-se diferença no período de 1 a 21 dias de idade onde os tratamentos CPP e CP + CPP diferiram do CN, porém não diferiram dos outros tratamentos. Não houve efeito da adição de qualquer dos aditivos sobre a profundidade da cripta e área de absorção no período de 1 a 41 dias de idade, porém, o tratamento PRO obteve a menor altura da vilosidade em relação a todos os outros tratamentos. Para a variável contagem bacteriana total (*E.coli*) houve uma diminuição acentuada em todo período experimental, exceto para as aves que receberam a dieta com CP que obteve a maior contagem bacteriana. Na coleta aos 27 dias o tratamento com CPP diferiu de todos os outros tratamentos. A

utilização do CPP melhora o ganho de peso e a conversão alimentar de 1 a 21 dias de idade, demonstrando assim sua eficácia.

Palavras-chave: ácido orgânico, desempenho, microbiota intestinal, óleo essencial, probiótico

Alternatives additives in feeding broilers.

Author: Caroline Oliveira Mendes

Advisor: Dr. Ricardo Duarte Abreu

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the effects of supplementation with different additives with a combination of essential oils associated with benzoic acid and probiotics as alternatives to diet on performance enhancers for broilers on performance characteristics (weight gain, consumption feed, feed conversion and mortality), intestinal morphology and total bacterial count of *Escherichia coli*. They used 1,632 broiler chicks Cobb500 lineage, one day old, in a completely randomized design, consisting of 6 treatments and 8 repetitions, with 34 birds each. The trial period of 41 days was divided into four stages of evaluation: at 7, 21, 35 and 41 days. The treatments were: basal diet without additives (CN-negative control); basal diet supplemented with essential oils (thymol, eugenol and piperine) and benzoic acid (CPP); basal diet with probiotics (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) (PRO), basal diet with CPP + PRO; Basal diet with enramycin 8% (-CP positive control); basal diet with CP + CPP. For the feed intake and mortality were observed effects of the treatments throughout the experimental period. To feed conversion not met effect of treatments in the period 1-41 days old, however, from 1 to 21 days, the treatments CPP, CPP + PRO and CP differed from CN. For the weight gain observed difference in the period 1-21 days of age where the CPP and CP + CPP treatments differed from the CN, but not different from other treatments. There was no effect of adding any of the additives on crypt depth and absorption area in the period from 1 to 41 days of age, however, the PRO treatment showed the lowest villus height in relation to all other treatments. For the variable total bacterial count (*E.coli*) there was a marked decrease in all experimental period, except for the birds fed the diet with CP who had the highest bacterial counts. In the collection to 27 days treatment with CPP differed from all other treatments. The use of CPP improved weight gain and feed conversion from 1 to 21 days of age, demonstrating its efficacy.

Keywords: organic acid, performance, intestinal microbiota, essential oils, probiotics,

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A produção de frango de corte no Brasil evoluiu de forma bastante expressiva nesses últimos anos, com ganhos no mercado internacional. O dinamismo da atividade avícola está atrelado à intensificação da produtividade, através da melhora das técnicas de manejo, inclusão de rigorosos programas sanitários nos plantéis, precisão na nutrição e melhoramento genético aplicado. Deste modo, segundo a UBABEF (2014), o Brasil, obteve maior inserção no mercado internacional, apresentando-se como o maior exportador e terceiro maior produtor mundial de carne de frango.

Entretanto a pressão por altos índices produtivos através do melhoramento genético vem reduzindo a rusticidade dos frangos de corte. Essa menor resistência sanitária associada ao atual modelo de produção animal intensivo, cujas aves recém-nascidas não têm contato prévio com uma microbiota natural, resulta em obstáculo para avicultura moderna. A ausência de contato com a microbiota natural logo após o nascimento pode afetar o desenvolvimento do trato gastrointestinal e prejudicar o crescimento das aves. Assim, em condições sanitárias desfavoráveis de campo, as aves ao chegarem às granjas ficam susceptíveis a desafios por microrganismos patogênicos, desta forma o desempenho produtivo pode ser afetado, principalmente por patologias entéricas e respiratórias (NUNES, 2008).

Para contornar esses desafios da avicultura moderna, antimicrobianos (antibiótico e quimioterápico) são utilizados com o intuito de prevenir essas enfermidades. Além da vacinação, nenhum outro avanço em sanidade foi mais significativo que o desenvolvimento dos antibióticos. Estes avanços tecnológicos modernos, empregados na produção animal, mudaram a indústria e proporcionaram grande eficiência à produção animal.

Na década de 50, pesquisadores descobriram que dosagens subclínicas de antibióticos nas rações de aves intensificavam o crescimento interferindo positivamente na eficiência de produção (FULLER, 1989). O acúmulo dessas

evidências resultou na inclusão destes antibióticos e quimioterápico na ração como prática rotineira e com amplo sucesso nos atuais modelos de produção. Atualmente são os principais aditivos de uso na alimentação animal, em particular na dieta de aves, sendo responsáveis pela melhoria na produtividade animal e principalmente nas fases iniciais de criação.

Contudo, em 2006 a União Européia banuiu o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal, embasada na alegação de que as moléculas de alguns desses aditivos promotores de crescimento apresentam semelhanças com os antibióticos utilizados na terapêutica humana, o que poderia, caso houvesse uso indiscriminado e contínuo, induzir, por pressão seletiva, a emergência de bactérias multirresistentes a essas drogas.

Sendo assim, intensificaram-se pesquisas de estratégias alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento. As empresas da área de nutrição animal vêm desenvolvendo, portanto, outros aditivos funcionais com o propósito de substituí-los, tais como: prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais. A suplementação da nutrição animal com aditivos alternativos como probiótico, óleos essenciais e ácidos orgânicos são apenas exemplos de estratégia em estudo no presente trabalho.

A forma como esses aditivos agem promovendo as modulações benéficas da microbiota intestinal resultam em efeitos imunomodulatórios que permitem reduzir o estresse imunológico. Conseqüentemente, a mobilização de nutrientes para recompor as perdas das atividades não relacionadas a produção seria reduzida. O resultado final é o melhor desempenho zootécnico com diminuição significativamente dos custos de produção (FERKET,2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes aditivos como óleos essenciais combinados ao ácido benzóico e probióticos como alternativas ao uso de antibioticos nas dietas para frangos de corte de 1 a 41 dias de idade, sobre as características de desempenho, morfometria intestinal e contagem de células microbianas de cepas de *Escherichia coli*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema digestório das aves

As aves não mastigam o alimento na boca, no entanto, possuem um divertículo chamado de inglúvio ou papo que umidifica e amolece o alimento além de um estômago químico que é responsável pela digestão química dos alimentos (proventrículo) e o estômago mecânico (moela) que tritura o alimento. O bolo alimentar nas aves passa por uma digestão mecânica, através do estômago muscular ou moela, antes de seguir a digestão intestinal. A moela é composta de potentes músculos que desintegram as partículas do alimento, preparando o bolo alimentar para a digestão intestinal (BERTECHINI, 2006).

O trato digestório está entre os tecidos que apresentam desenvolvimento pós-eclosão, pois os mecanismos indutores do desenvolvimento da mucosa do trato gastrointestinal estão na dependência de fatores intrínsecos e extrínsecos, como os níveis de hormônios circulantes, características físicas e químicas da dieta e atualmente têm-se demonstrado que as funções absorptivas e secretoras estão na dependência da interação entre nutrientes e expressão de genes (MAIORKA et al., 2000).

Ao nascimento, o sistema digestivo dos pintos já se encontra anatomicamente completo, no entanto a capacidade funcional ainda está muito aquém da observada nas aves adultas (OVERTON e SHOUP, 1964). Segundo Sklan (2005), após o nascimento os enterócitos das aves passam de uma forma arredondada e relativamente não polar, para uma forma alongada e polar. A altura e a área das vilosidades aumentam rapidamente, no entanto de forma diferenciada em cada segmento do intestino, alcançando valores máximos após 6-8 dias no duodeno e 10 dias no jejuno e no íleo.

Os componentes relacionados ao sistema digestivo apresentam crescimento alométrico em relação à carcaça nas duas primeiras semanas de vida, sendo o crescimento do pâncreas e do intestino delgado quatro vezes maior que o resto do corpo nos primeiros 23 dias de idade das aves (NITSAN et al.,

1991).

O trato digestório sofre um processo de maturação na fase pós-eclosão semelhante ao que ocorre com os sistemas termorregulador e imunológico (FURLAN et al., 2004). As aves passam por um processo adaptativo muito estressante, pois deixam de se alimentar com uma dieta endógena, rica em lipídeos e proteínas fornecidos pelo saco vitelino, para se alimentarem de uma dieta exógena composta por lipídeos, proteínas e carboidratos complexos, sendo estes de difícil metabolização para o trato gastrointestinal das aves que ainda é imaturo logo após a eclosão (FURLAN et al., 2004).

Para melhor o entendimento dos processos de maturação, reparo e manutenção da mucosa intestinal frente a diferentes dietas ou lesões induzidas por agentes patogênicos e de como os agentes tróficos podem interferir no desenvolvimento e manutenção da qualidade intestinal, é necessário conhecer as estruturas existentes, as funções desempenhadas por estas estruturas, bem como a organização que estas apresentam (BOLELI et al., 2002). A mucosa intestinal é composta por projeções denominadas vilos, que por sua vez são compostos por três tipos de células diferentes, os enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas (MAIORKA, 2004).

Os enterócitos são células tipicamente colunares, que apresentam um processo de maturação que acontece durante a migração da cripta para o ápice do vilo e são responsáveis pelo transporte trans-epitelial dos nutrientes a partir do lúmen (MAIORKA et al., 2000).

O transporte dos nutrientes a partir do lúmen corresponde à entrada e posterior saída dos nutrientes dos enterócitos em direção aos vasos sanguíneos, processo que comumente é denominado de absorção. As células enteroendócrinas são produtoras de substâncias que participam na regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes e controlam as funções fisiológicas. Já as células caliciformes são as responsáveis pela secreção de muco glicoprotéico, este muco é responsável por proteger o epitélio intestinal da ação das enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta. Devido à grande aderência à superfície, o muco não é totalmente removido, mesmo durante a ação das vigorosas forças mecânicas que ocorrem durante a digestão (FRANZO, 2006). A capacidade de digestão e absorção é diretamente dependente do número de

enterócitos e da altura e número de microvilos existentes (SOLCIA et al., 1978). Segundo Maiorka et al. (2000), os microvilos como projeções da membrana luminal do enterócito creditam grande importância a estas estruturas, que atuam como amplificadores da área de absorção de nutrientes.

A mucosa intestinal é a interface entre a ave e o meio externo e o bom funcionamento das funções vitais exercidas por esta, depende de uma adequada relação entre perda e proliferação celular, o balanço destes processos é denominado turnover. O processo de perda é decorrente da espoliação e extrusão que ocorre na superfície do vilos, já a proliferação celular ocorre pelas divisões mitóticas nas células-mãe na região da cripta. Quando um agente estimulador promove uma resposta do intestino a favor de um dos processos, ocorrem alterações na altura das vilosidades, prejudicando ou beneficiando o desempenho do animal (TUCCI, 2003).

Furlan et al. (2004) ressaltam que ao longo do trato gastro intestinal a taxa de turnover, bem como a densidade e o tamanho dos vilos não são os mesmos. O duodeno possui as maiores alturas de vilos e taxa de renovação da mucosa, o que se justifica pelo fato deste ser o principal sítio de digestão e absorção de nutrientes.

A integridade intestinal é essencial para que os processos de digestão e absorção sejam eficientes. A manutenção da mucosa intestinal e a redução da colonização de bactérias patogênicas que são capazes de danificar a mucosa, por causa de sua aderência e também pela produção de compostos tóxicos tais como amônia, são importantes para garantir bom aproveitamento dos nutrientes. (OLIVEIRA e MORAES, 2007).

2.2 Microbiota intestinal dos frangos de Corte

A microbiota natural do sistema digestório dos frangos de corte é bastante complexa e de difícil definição. Essa microbiota é composta de muitas espécies, que vivem em equilíbrio entre si e com o hospedeiro e aproximadamente 10^{12} micróbios/g passam no trato gastrointestinal, que corresponde a um número maior que a quantidade total de células de um organismo (KAWAZOE, 2009). A presença dessa biota intestinal normal, em equilíbrio, é tão necessária quanto benéfica para o bem estar do animal, estabelecendo uma relação de mutualismo ou de

cooperativismo (BERCHIEIRI JUNIOR et al.,2009). Essa microbiota permanente e transeunte é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, e pode-se encontrar de 200 a 400 espécies diferentes de bactérias e 100 trilhões de microrganismos, onde estes não possuem participação direta no processo digestivo (FOX, 1988; LEEDLE, 2000).

Estima-se que 90% da microbiota seja composta por bactérias facultativas (aeróbicas/anaeróbicas) e produtora de ácido láctico (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*) incluídas as bactérias exclusivamente aeróbias com os *Bacterioides spp*, *Fusobacterium spp* e *Eubacterium spp*. Os 10% restantes dessa flora são constituídas de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas, a *Escherichia coli*, *Clostridium spp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Blastomyces spp*. O desequilíbrio, em favor das bactérias indesejáveis, resulta em infecção intestinal severa, afetando diretamente o desempenho animal, podendo levar a morte (LODDI, 2001).

A distribuição da população bacteriana no trato gastrointestinal de aves comerciais é qualitativa e quantitativamente grande. Após a eclosão, o trato gastrointestinal é rapidamente colonizado e estende-se desde o inglúvio até a cloaca (MARCH, 1979). As bactérias que colonizam o trato gastrointestinal no início tendem a persistir ao longo da vida da ave, passando a compor a microbiota intestinal. Aproximadamente 85% dos organismos isolados do duodeno, jejuno, íleo e ceco são gram-positivos. A maioria das bactérias do intestino delgado são anaeróbias facultativas, ao passo que as bactérias anaeróbias estritas incluem a maior parte da microbiota, tanto do cólon quanto do ceco (SALANITRO et al., 1978; LANCINI, 1994).

No estado natural, o animal obtém a sua flora intestinal através do contato com as bactérias da mãe. Essa flora, uma vez estabilizada, auxilia o animal a resistir a infecções bacterianas de campo, principalmente relacionadas a infecções gastroentéricas e respiratórias. Entretanto, os frangos de corte industriais são pouco resistentes a infecções de campo, pois o ovo fértil obtido da ave matriz é eclodido em máquinas de incubação de grande controle sanitário, não havendo contato dos pintinhos com a galinha. Assim, o pinto recém-eclodido adquire parcialmente sua microflora do ambiente do incubatório, enquanto que as aves domésticas obtêm as bactérias logo após o nascimento via bico, papo ou excrementos das mães (MEAD, 2000).

Silva et al. (2009) enfatiza que a pouca diversidade da microflora intestinal das aves recém-nascidas provenientes dos incubatórios, além de ser considerada fator limitante no processo digestivo, também possibilita a colonização intestinal por patógenos entéricos. Por isso, o fornecimento imediato de doses subterapêuticas de antibióticos para pintos industriais favorece a formação de uma microbiota saudável e equilibrada, sem acarretar perdas produtivas e econômicas na produção de frango de corte. Segundo Silva (2000), a formação dessa microbiota ocorre imediatamente após o nascimento das aves e aumenta durante as primeiras semanas de vida, até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbias.

Conforme as condições do ambiente, tipo e estrutura da ração e fatores fisiológicos e estressores, podem ocorrer uma variação da população microbiana ao longo do trato gastrointestinal. Dessa maneira, diferentes populações se estabelecem, com uma sucessão na qual alguns tipos prevalecem e outros declinam de acordo com as variações acima citadas (MARUTA, 1993; BERTECHINI, 2006).

As bactérias favoráveis ao hospedeiro podem ter seu crescimento estimulado, quando são inibidas as bactérias sensíveis aos antibióticos. As bactérias patogênicas podem estar presentes no trato gastrointestinal, entretanto, apenas quando ocorrem alterações, a exemplo de fatores de que causam estresse no animal, a seu favor, estas podem se proliferar e atingir número suficiente para produzir sintomas clínicos. Normalmente estas bactérias estão em números suficientes para reduzir o ganho de peso e eficiência alimentar (MARCH, 1979).

2.3 Aditivos destinados à alimentação animal

Os aditivos alimentares podem ser definidos como todos os ingredientes utilizados de forma intencional na alimentação sem a finalidade de nutrir, tendo como propósito exclusivo, alterar as características químicas, biológicas, físicas ou sensoriais dos alimentos. Esta categoria não inclui contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam adicionadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 2004).

Os aditivos alimentares com fins zootécnicos no Brasil são definidos como toda substância utilizada para influir positivamente na melhoria do desempenho

animal, sendo estes divididos em três grupos funcionais: digestivos, substâncias que facilitam a digestão dos alimentos ingeridos, atuando sobre as matérias-primas destinadas à fabricação de produtos para alimentação animal; equilibradores da flora do trato digestório: micro-organismos que formam colônias ou outras substâncias definidas quimicamente que tem um efeito positivo sobre a flora do trato digestório; e os melhoradores de desempenho, substâncias definidas quimicamente que melhoram os parâmetros de produtividade (BRASIL, 2004).

Entre os principais aditivos alimentares naturais, utilizados em substituição aos antibióticos, destacam-se os equilibradores da microbiota do trato gastrointestinal os probióticos, prébióticos, simbióticos, acidificantes e óleos essenciais, pois são substâncias definidas quimicamente e que melhoram os índices de produtividade dos animais, (GONZALES, 2006).

Um dos maiores desafios na produção animal tem sido a busca por alternativas para reduzir o uso dos antibióticos devido às crescentes pressões impostas por legislações de países que importam produtos de origem animal que proíbem a inclusão de antimicrobiano na dieta de frango. Com isso, a nutrição animal é bastante dinâmica, sempre lançando mão de novas estratégias para melhorar o aproveitamento dos nutrientes dietéticos, na tentativa de garantir o máximo crescimento dos animais sem que haja acréscimos aos custos e sem afetar a qualidade do produto final (JEAUROUND, 2002; ARAÚJO, et al.,2007).

Soares (1996) concluiu que um promotor de crescimento ideal deve proporcionar um aumento do desempenho das aves, apresentar um bom custo/benefício, ser atóxico, não alterar drasticamente a microflora intestinal, atuar exclusivamente ao nível intestinal, não estar envolvido em transferência de resistência, não possuir resistência cruzada com outros antibióticos (em especial os de uso na terapêutica humana), não deixar resíduos na carcaça dos animais após sua retirada e ser biodegradável.

Os melhoradores de desempenho interferem na secreção de enzimas e sucos gástricos, exercendo uma influência significativa sobre a digestibilidade dos nutrientes e podem promover alterações positivas sobre a histologia do epitélio intestinal, como a redução da profundidade das criptas e aumento da altura das vilosidades (BUTOLO, 1999).

Nessa revisão de literatura, aprofundaremos nos principais aditivos utilizados nesse experimento como antibióticos, próbióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais.

2.3.1 Antibióticos

Os antibióticos são metabólitos naturais produzidos por fungos, com capacidade de impedir o desenvolvimento bacteriano, modificando determinadas propriedades do metabolismo da célula bacteriana (FERKET, 2003). O termo quimioterápico foi introduzido no início do século XX, referindo-se à substância química definida (produzida por síntese laboratorial) que, introduzida no organismo animal, age de maneira seletiva sobre o agente causador do processo infeccioso, sem causar efeito nocivo sobre o hospedeiro (GÓRNIAK e SPINOSA, 2007).

Os primeiros relatos que comprovam os efeitos benéficos dos antibióticos profiláticos datam de 1946, que confirmam um efeito positivo no crescimento de frango de corte com o uso de estreptomicina (LANGHOUT, 2005).

Dentre os benefícios advindos do uso de aditivos antimicrobianos na avicultura de corte destacam-se: aumento da produtividade, diminuição da quantidade de alimento consumido pelos animais até o momento do abate, melhoria da eficiência alimentar, bloqueio dos processos microbiológicos ligados à deterioração da ração, prevenção de doenças infecciosas ou parasitárias e, dentre tantos outros efeitos de igual relevância, diminuição da mortalidade (ALBUQUERQUE, 2005).

Os antibióticos, quando usados em níveis subterapêuticos em rações de animais, proporcionam aumento no ganho de peso, melhora da conversão alimentar e redução da mortalidade (IAFIGLIOLA et al., 2000).

No que diz respeito aos eventos nutricionais, Albuquerque (2005) destaca que cada antimicrobiano tem seu próprio espectro de ação, podendo produzir alterações diferenciadas na composição e metabolismo da flora entérica.

Nos últimos anos, com a intensificação dos sistemas de produção animal, os animais são criados em densidade cada vez mais elevadas, o que tem aumentado o risco de disseminação de micro-organismos patogênicos, visto que os sistemas de desinfecção das granjas não permitem a criação de animais em ambientes isentos desse micro-organismos, desta forma o uso de aditivos, como

os antimicrobianos promotores de crescimento tornou-se quase uma obrigatoriedade (SANTOS e TURNES,2005).

Na ausência de bactérias gastrointestinais, devido à presença de antibióticos na dieta, a necessidade do recrutamento de células imunes para o intestino está reduzida e conseqüentemente o desempenho animal é melhorado (ARAÚJO et al., 2007).

A administração de antimicrobianos na avicultura é realizada, geralmente, através da água de bebida, porque as aves doentes podem parar de comer, mas, frequentemente, continuam a consumir água. Por outro lado, os antimicrobianos promotores de crescimento são fornecidos na ração por apresentar maior facilidade de manuseio (SINGER e HOFACRE, 2006).

O modo de ação dos antibióticos promotores de crescimento não está completamente claro, mas têm sido propostos inúmeros mecanismos para explicar o efeito promotor de crescimento desses aditivos. De acordo com Lancini (1994), os antibióticos devem atuar impedindo o metabolismo bacteriano e reduzindo a competição direta pelos nutrientes entre a bactéria e o hospedeiro. Devem reduzir a produção microbiana de metabólitos tóxicos, como as aminas, amônia e endotoxinas, que podem afetar o epitélio e ainda impedir a digestão e absorção de nutrientes. Com isso, foi observado por Soares (1996), que há uma diminuição de células inflamatórias na parede intestinal e diminuição do grau de descamação e renovação das vilosidades, tornando a parede mais lisa e delgada.

A prova que os antibióticos atuam provavelmente inibindo organismos responsáveis por infecções subclínicas e reduzindo inflamações no epitélio intestinal segundo Brock et al. (1994), tem sido demonstrado em ensaios animais livres de patógenos, os quais não apresentaram melhoria no desempenho ao receberem rações com antibióticos. Além disso, a parede intestinal dos animais normais é mais espessa do que os animais livres de germes, provavelmente devido ao nível de inflamação causado pela flora bacteriana.

As bactérias resistentes aos antibióticos podem ser transmitidas ao ser humano a partir do consumo de produtos de origem animal, entretanto, não se pode determinar ainda os riscos dessa transmissão para a saúde pública. Entre os microrganismos potencialmente letais que podem ser transmitidos ao homem estão a *Salmonella* e a *Escherichia coli* (CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN, 1999).

Segundo Smith (1975), é possível que resíduo de antibiótico em produtos animais, para o consumo humano, possa produzir toxicidade, reações alérgicas em pessoas previamente sensibilizadas, ou surgimento de cepas de bactérias resistentes aos antibióticos.

Todavia, mais provável que uma parcela significativa da resistência a antibióticos ocorra devido ao uso inadequado dos mesmos na medicina humana (WHO, 1997). Existem dados limitados a respeito do impacto negativo significativo na saúde humana, com origem no uso de antibióticos na produção avícola e de outros animais (ERPELDING, 1999).

Mesmo assim, para reduzir a probabilidade de resistência, a União Européia proibiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento nos animais destinados ao consumo humano, permitindo seu uso apenas para o tratamento de enfermidades específicas. (RUTZ et al.,2001).

Segundo Bresslau (2009), os aditivos antimicrobianos autorizados para uso em avicultura são avilamicina, bacitracina metileno disalicilato, bacitracina de zinco, clorexidina, colistina, enramicina, eritromicina, espiramicina, flavomicina/bambermicina, halquinol, lincomicina, tilosina e virginiamicina. Os aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente são avoparcina (Ofício Circular DFPA nº 047/1998), penicilina, tetraciclina, sulfanamidas sistêmicas (Portaria nº 193, 12/05/1998); arsenicais e antimoniais (Portaria nº 31, 29/01/2002), clorafenicol e nitrofuranos (Instrução Normativa nº 09, 27/06/2003); hormônios como aditivos alimentares em aves (Instrução Normativa nº 11, 24/11/2004); carbadox (Instrução Normativa nº 35, 14/11/2005), violeta Genciana (Instrução Normativa nº 34, 13/09/2007).

Com a retirada dos antibióticos promotores de crescimento a principal consequência clínica foi um aumento na incidência de enterite necrótica (tanto subclínica quanto clínica). Essa medida ocasionou uma redução nos índices de desempenho das aves e aumentos nos custos de produção. O aparecimento de quadros clínicos envolvendo crescimento microbiano desordenado no intestino aumentou, o que levou ao aumento da demanda de antibióticos para o tratamento de animais enfermos. Porém os sistemas de produção com bom nível de saúde, rígido programa de biossegurança e manejo, nutrição, instalações e equipamentos adequados, tem uma menor influência na queda de produção na ausência desses aditivos (ALLIX, 2010).

Pesquisadores sensibilizados com o problema gerado pela utilização dos antibióticos como melhoradores de desempenho em rações de frango de corte vêm procurando alternativas ao seu uso, utilizando aditivos naturais como substituintes aos antibióticos, onde os mesmos vêm promovendo resultados positivos inibindo grandes danos produtivos e econômicos aos produtores (RUTZ et al., 2006).

2.3.2 Probióticos

Segundo Fuller (1989), os probióticos são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço da microbiota intestinal.

Probióticos são cepas de microrganismos vivos, que atuam como precursores na normalização da microbiota do trato digestório dos animais, reduzindo o número dos microrganismos patogênicos (BRASIL, 2004).

Os probióticos agem povoando a mucosa intestinal, incitando a imunidade, fornecendo substâncias antimicrobianas, e enzimas, promovendo a competição com bactérias por nutrientes (KÜRTI, 2004; FLEMMING e FREITAS, 2005; JUNQUEIRA e DUARTE, 2005; SAXELIN et al., 2005; SANTANA et al., 2011).

Ao se pesquisar alternativas para a substituição dos antibióticos na produção animal, estudiosos centralizaram suas atenções em um dos mecanismos de defesa natural dos animais favorecendo a multiplicação de microrganismo que produzam substâncias antimicrobianas capazes de aderir-se à mucosa intestinal e impedir a fixação de bactérias enteropatogênicas. Assim, os probióticos passaram a ser uma alternativa eficaz de substituição os antibióticos, agindo como promotores de crescimento no tratamento de diarreias alimentares e/ou bacterianas. (AHMAD, 2006).

Segundo Fuller (1989), um microrganismo tem que possuir certas características para poder ser considerado probiótico, como ser produzido em larga escala; permanecer viável e estável em condições de estocagem; sobreviver no trato gastro intestinal; ser capaz de aderir às células do intestino; ser atóxico e não patogênico para o hospedeiro.

Os microrganismos utilizados como probióticos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus faecium*, bactérias gram-positivas produtoras de ácido lático,

habitantes naturais do trato gastrointestinal e que agem efetivamente como probióticos, aderindo ao epitélio intestinal e colonizando o trato. Outros, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyo* e *Bacillus bifidum* são utilizados combinados, isolados ou às vezes associados a leveduras, enzimas e outros agentes, com a finalidade de auxiliar as bactérias produtoras de ácido láctico na sua colonização (MARUTA, 1993).

Dentre estes, os microrganismos mais utilizados são *Bacillus subtilis* (classificado como transitório no trato gastrointestinal, pois não possui a capacidade de se fixar ao epitélio intestinal, mas a de auxiliar na multiplicação e colonização dos produtores de ácido láctico); *Lactobacillus acidophylus* (bactéria que produz ácido láctico a partir da fermentação de açúcares é anaeróbica facultativa e é exigente nutricionalmente, necessitando para o seu crescimento das vitaminas: niacina, riboflavina e ácido fólico); além do *Enterococcus faecium* (microrganismo bastante agressivo e um pouco mais resistente a altas temperaturas do que os *Lactobacillus*).

Segundo Santana et al. (2011), os mecanismos de ação dos probióticos não estão totalmente elucidados e compreendidos, porém sabe-se que a atuação está relacionada à competição por sítios de ligação (exclusão competitiva), ou seja, as bactérias probióticas ocupam sítios de ligação na mucosa intestinal, formando uma barreira física às bactérias patogênicas. Além deste mecanismo, as bactérias probióticas competem por aminoácidos e açúcares, auxiliando a inibição de bactérias enteropatogênicas.

Como o mecanismo de exclusão competitiva não está totalmente esclarecido, entretanto várias pesquisas foram feitas e pode-se levantar algumas formas de atuação dos probióticos (FOX, 1988; JIN et al., 1997):

- a) No intestino, os microrganismos do probiótico realizarão uma rápida metabolização de substratos (açúcares, vitaminas, aminoácidos, proteínas), tornando-os indisponíveis aos patógenos e, por consequência, impedindo a proliferação destes (Figura 1).
- b) Através da produção do ácido láctico, provocam uma redução no pH intestinal, tornando o meio impróprio para a multiplicação dos agentes patogênicos.
- c) Secretam proteínas (bacteriocinas) que têm uma ação inibitória ou destrutiva contra uma cepa específica de bactéria.

- d) As bactérias produtoras de ácido lático podem estimular a produção de anticorpos e a atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do corpo (Figura 2).
- e) Bactérias benéficas aumentam a atividade enzimática no trato gastrointestinal.
- f) Aumento da área de absorção do intestino delgado.
- g) A interação destes mecanismos promove equilíbrio da microbiota intestinal, o que trará diversos benefícios ao animal (Figura 3).

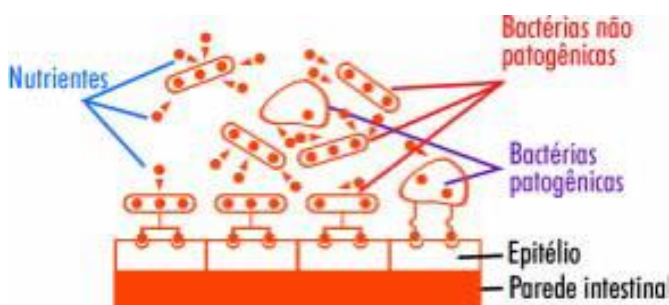


Figura 1- As bactérias patogênicas e não patogênicas geralmente competem por nutrientes. As não patogênicas tem maior poder de competição, colonizando melhor o intestino (FOX, 1998).

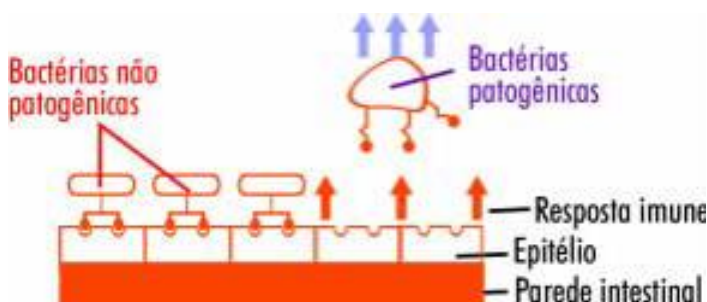


Figura 2- As bactérias não patogênicas atuam como antígeno potencializando a resposta imunológica no hospedeiro. Os patógenos são repelidos pelos receptores das células epiteliais (FOX,1998).



Figura 3- Efeitos das bactérias não patogênicas no trato intestinal (FOX,1998).

Tem sido relatado, também, que alguns probióticos afetam a translocação de bactérias patogênicas (passagem de microrganismos através de mucosas) a partir do intestino, o que seria de grande importância para evitar as infecções de origem entérica, entre as quais por salmonelas (SANTOS e TURNES, 2005).

Pelicano et al. (2005) complementam dizendo que os probióticos também atuam produzindo substâncias antimicrobianas, ácidos orgânicos, absorvendo toxinas produzidas por patógenos e estimulando o sistema imune. Segundo Furlan et al. (2004), o estímulo imunológico ocorre pelo fato dos probióticos produzirem respostas imunes sistêmicas, aumentando o número e atividade de células fagocíticas do hospedeiro e ativação de macrófagos. O estímulo da fagocitose pelos macrófagos é produzido pela absorção de antígenos solúveis ou pela translocação de lactobacilos da parede intestinal para a corrente sanguínea (REVOLLEDO, 2005).

Segundo Pelicano et al. (2005) observaram maior altura das vilosidades no jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade, quando estes foram alimentados com dietas contendo *Bacillus subtilis* em comparação com o tratamento controle, onde não foi utilizada suplementação com nenhuma espécie de probiótico demonstrando que a utilização dos probióticos pode ser benéfica para o desenvolvimento de uma condição favorável em termos de epitélio intestinal.

A utilização de probióticos como aditivos alimentares tem sido cada vez mais pesquisada e empregada. Bertechini e Hossain (1993) relataram que a utilização do probiótico pode proporcionar maior ganho de peso, melhor conversão alimentar e maior rendimento de carcaça.

Quando se pretende usar algum probiótico deve-se ter em mente que nem todos os probióticos podem ser utilizados em determinados tipos de processamento de ração devido à pouca resistência que apresentam a altas temperaturas (FERREIRA e KUSSUKAWA, 2008).

Outro fator que deve ser observado e assimilado é de que nem sempre os probióticos apresentam resultados positivos em relação a ganho de peso e conversão alimentar das aves, isso se deve a diversas variantes, tais como: sanidade das aves, tempo de desocupação do galpão e nível de contaminação ambiental. Aves alojadas em locais que se apresentam há bastante tempo desocupados tendem a apresentar resultados pouco significativos em relação à

utilização de probióticos, ocorrendo o mesmo para locais com baixo nível de contaminação ambiental. Além disso, alguns fatores como idade do animal, tipo do probiótico, viabilidade dos microrganismos, condições de armazenamento, condições de manejo e desafio sanitário podem afetar a eficácia dos probióticos (SOUZA, 2010).

Sendo assim, pode-se considerar que a utilização de probióticos na alimentação de frangos de corte não pode ser vista como algo milagroso, mas sim, como um aditivo que poderá auxiliar em problemas de diversas naturezas dentro do aviário, além de não deixar resíduos indesejáveis na carcaça da ave, podendo ser utilizados na alimentação dos frangos de corte.

2.3.3 Ácidos Orgânicos

Ácidos orgânicos são aqueles que apresentam átomos de carbono na sua estrutura básica. Entre estes, o maior grupo é aquele que possui o grupo funcional carboxila (COOH), o que confere a estes ácidos a propriedade de serem ácidos fracos em meio aquoso (SNYDER, 2003).

Os ácidos orgânicos são amplamente utilizados em animais monogástricos para melhorar o desempenho através de uma modulação da microflora intestinal. Os ácidos orgânicos agem reduzindo o pH gástrico e intestinal, estimulando a secreção pancreática e ativando a pepsina, levando a um aumento na digestibilidade proteica (MROZ et al., 2000). O acréscimo da secreção enzimática pelo pâncreas em resposta à acidificação do trato gastrointestinal pode resultar no aumento da digestibilidade (PARTANEN, 2001). Além da diminuição do pH, os ácidos diminuem a capacidade de aderência de bactérias com fímbria à parede intestinal, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal e a palatabilidade das rações, alterando assim o metabolismo intermediário, fornecendo energia com baixo incremento calórico (LANGHOUT, 2005; BERTECHINI, 2006; RIBEIRO, 2008).

Os ácidos tinham a função de conservantes, evitando a deterioração dos alimentos e aumentando a vida útil de ingredientes perecíveis. Atualmente, são utilizados para reduzir a contaminação microbiana e a disseminação de doenças veiculadas por alimentos (RICKE, 2003).

De acordo com Dibner e Butin (2002), os ácidos orgânicos associados com atividade antimicrobiana são os ácidos graxos de cadeia curta como (propiónico,

acético, benzoico, fumárico, fórmico, láctico e cítrico) ou ácidos graxos de cadeia média (cáprico, capróico e láurico) utilizados como aditivos na alimentação animal.

Langhout (2005) afirma que as bactérias possuem capacidade de absorver facilmente os ácidos orgânicos através da sua parede celular, porém em sua forma não dissociada, os ácidos não conseguem atravessar a parede celular das bactérias. A única forma de garantir que a dissociação aconteça no lúmen intestinal, segundo Gauthier (2002), é protegê-los no interior de uma matriz que tenha a habilidade de atravessar a parte superior do trato gastrintestinal sem se desnaturar. Ao penetrarem nas bactérias, dissociam-se, promovendo diminuição do pH interno e elevação do gasto de energia para eliminar o excesso de H^+ . O acúmulo de ânions perturba, também, a fisiologia normal da célula ao interferir na síntese de DNA, o que impede que a proteína não se replique (LIPPENS et al., 2006). No entanto, Stratford et al. (2009) afirmam que nem todos os ácidos precisam reduzir o pH no citoplasma para exercer sua atividade antimicrobiana, citando como exemplo o ácido sórbico que não reduz o pH citoplasmático em concentrações inibitórias mínimas, mas lesa a membrana citoplasmática, reduz a sua integridade, aumenta a sua permeabilidade a prótons e leva o microrganismo à morte.

Normalmente os ácidos orgânicos de cadeia curta são efetivos contra microrganismos patogênicos (*E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*), mas, os resultados obtidos no campo com o seu uso têm sido variáveis, devido às suas diferentes características físico-químicas, diferenças no seu modo de ação, condição ambiental, dose utilizada e à capacidade tampão dos ingredientes, que influencia no pH do trato gastrintestinal e, por conseguinte, na heterogeneidade da microbiota intestinal (DIBNER e BUTTIN, 2002; RICKE, 2003).

Segundo Faria et al. (2009), os ácidos orgânicos atuam inibindo o desenvolvimento de fungos nas matérias-primas e rações, diminuindo a proliferação de enterobactérias no intestino e potencializando ganhos nutricionais das rações.

Os ácidos orgânicos também são encontrados na forma de sais de sódio, potássio ou cálcio, o que é uma vantagem por possuírem odor menos acentuado e apresentarem-se na forma sólida, facilitando a sua inclusão na dieta, mas

possuem menor influência sobre a redução do pH da dieta do que os ácidos orgânicos (CANIBE et al., 2001).

Por apresentarem efeito inibidor sobre o desenvolvimento fúngico e bacteriano, o uso de ácidos orgânicos e de seus sais em matérias-primas e em rações para aves tem crescido muito nos últimos anos (TAKO, et al., 2004; GUYNOT et al., 2005; VIOLA, 2006; NAMKUNG et al., 2011).

Langhout (2005) sugeriu uma associação entre ácidos orgânicos e óleos essenciais, já que os ácidos orgânicos agem principalmente na dieta e parte anterior do trato gastrointestinal e os óleos essenciais são ativos na porção inferior do intestino delgado. Além desse efeito aditivo entre ácidos orgânicos e óleo essencial, foi sugerida também devido ao fato de que as enzimas digestivas trabalham mais eficientemente em condições ácidas.

Viola e Vieira (2007), verificaram que a suplementação de misturas de acidificantes em dietas para frangos de corte produziu benefícios similares aos obtidos com o uso de antibióticos promotores de crescimento em relação ao desempenho zootécnico e à morfologia intestinal.

Recentemente, o ácido benzoico foi identificado como um aditivo eficaz para melhorar o desempenho de crescimento, a digestibilidade de nutrientes, balanço de nitrogênio, bem como para reduzir as bactérias gram-negativas no trato gastrointestinal de leitões (KLUGE et al., 2010).

2.3.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são óleos voláteis extraídos de produtos vegetais obtidos por processo da destilação a vapor d'água ou da atividade enzimática seguida de destilação a vapor d'água. Eles abrangem toda uma gama de componentes, como os terpenóides, álcoois, aldeídos, ésteres cíclicos, etc.(TOLEDO et al., 2007).

Segundo a Resolução - RDC nº2, de 15 de janeiro de 2007–ANVISA, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem ser encontrados isolados ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham

sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos.

Diversos estudos relatam os efeitos antimicrobianos (MITSCH et al., 2004), antioxidantes (RACANICCI et al., 2004; 2008) digestivos (KAMEL, 2000) dos extratos vegetais, e aromatizantes (WEBER, et al., 2012) caracterizando-os como potenciais substitutos dos antibióticos melhoradores do desempenho.

Os mecanismos pelos quais os óleos essenciais melhoram o desempenho dos animais ainda não estão muito claros. Entretanto, acredita-se que estes estimulam a secreção de enzimas endógenas, facilitam a digestão, estimulam a circulação sanguínea, exercem propriedades antioxidantes, alteram a microflora intestinal e ajudam na redução de infecções bacterianas e fúngicas, reduzindo os níveis de bactérias patogênicas, sendo assim podem melhorar o estado imunológico (PEREIRA et al., 2006; GARCIA et al., 2007; JANG et al., 2007; SANTURIO et al., 2007; BONATO et al., 2008). As ações dos seus componentes parecem que tem a capacidade de aumentar à permeabilidade da parede celular do micróbio e/ou a desativação enzimática das células.

Os efeitos positivos dos extratos vegetais na nutrição animal estão associados aos princípios ativos, componentes químicos presentes em todas as partes das plantas ou em áreas específicas (KAMEL, 2000) que conferem às plantas medicinais algumas atividades terapêuticas (Martins *et al.* 2000). Segundo Kamel (2000), os princípios ativos são os componentes presentes em maior quantidade na planta, porém pesquisas comprovam que os componentes secundários, presente em menores quantidades, atuam potencializando o efeito do princípio ativo.

Os extratos vegetais, usados como antimicrobianos fitoquímicos, têm demonstrado efeito antimicrobiano *in vitro*, entretanto sua influência no desempenho de aves ainda não foi suficientemente documentada. De acordo com Hernández et al. (2004), extratos de compostos fenólicos com atividade antimicrobiana e antifúngica, podem controlar e limitar o crescimento e a colonização de bactérias patogênicas no intestino e melhorar a digestibilidade da matéria seca, do amido e da proteína, dependendo da fase de criação.

Kassie (2009), ao adicionar óleos extraídos do tomilho e canela em rações de frangos, observou melhores valores de ganho de peso e de conversão alimentar aos 42 dias de idade. Também, Traesel et al. (2010), verificaram que

frangos de corte alimentados com óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato de pimenta (OLES) na dosagem de 100 mg/kg obtiveram peso final com 42 dias e ganho de peso similares àqueles observados em animais suplementados com antibióticos promotores de crescimento, mas que a mistura OLES pode ocasionar efeitos tóxicos em frangos quando aplicada em altas dosagens. Entretanto, Barreto et al. (2008), ao adicionar óleos essenciais de orégano, pimenta, cravo e canela em rações de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade, não observaram efeito sobre o desempenho das aves.

Langhout (2000) acredita que a administração de combinação de óleos essenciais de plantas na dieta dos animais proporcione melhores resultados de desempenho em comparação aos produtos utilizados isoladamente.

Os componentes dos óleos essencial do orégano (carvacrol e o timol) tem grande probabilidade de substituir os antibióticos. O carvacrol é o mais ativo, pois possui amplo espectro antibacteriano atuando em fungos, leveduras e bactérias gram-negativas e gram-positivas (SUZUKI et al., 2008). Helander et al., 1998, demonstrou que o carvacrol e timol exerceram o seu efeito antimicrobiano sobre *E. coli* O157 e *Salmonella typhimurium* por desintegração da membrana das bactérias.

Lee et al., (2003) relatou a digestibilidade dos nutrientes em relação a composto timol, cinamaldeído, ou uma preparação comercial a base de timol, eugenol e piperina onde demonstrou aumentar a atividade da amilase na digesta intestinal de frangos de corte. Com um extrato vegetal, composto de capsaicina, cinamaldeído e carvacrol, Jamroz et al. (2005) observaram um aumento na atividade da lipase no pâncreas e na parede intestinal, o que melhorou a conversão alimentar em frangos de corte. Da mesma forma, extratos de plantas a partir de uma mistura de orégano, canela e pimenta ou de sálvia, tomilho e alecrim, melhoraram aparentemente todo o trato digestivo e a digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte (HERNÁNDEZ et al., 2004).

Para a produção de aves comerciais, os efeitos antimicrobianos de OE, também, são de interesse particular. Relatos de atividades in vitro de largo espectro têm sido verificados para orégano (PREUSS et al., 2005), para extratos de alecrim (SANTOYO et al., 2005), ou do óxido de etileno a partir de crisântemo (SHUNYING et al., 2005). Além disso, para os óleos de orégano e tomilho foram encontradas atividades contra cepas *Escherichia coli* e *Salmonella* de aves de

capoeira e de suínos (PENALVER et al., 2005). Misturas específicas de componentes de óxido de etileno demonstraram controlar a colonização e a proliferação de *Clostridium perfringens* no intestino de aves, o que é esperado para proteger contra a enterite necrótica (MITSCH et al., 2004). Uma mistura de capsaicina, cinamaldeído, e carvacrol reduziu a quantidade de *E. coli* intestinais, *C. perfringens* e fungos e aumentou o número de *Lactobacillus spp.* em frangos (JAMROZ et al., 2005).

A associação entre óleos essenciais e os ácidos orgânicos é sugerida por Langhout (2005) já que os ácidos orgânicos agem principalmente na dieta e parte anterior do trato gastrointestinal e os óleos essenciais são ativos na porção inferior do intestino delgado, além de que as enzimas digestivas trabalham mais eficientemente em condições ácidas.

Diante da expectativa da proibição do uso de antibióticos promotores de crescimento nas rações de frangos de corte e da busca efetiva por um aditivo eficiente na redução dos microrganismos patogênicos para a melhoria do desempenho zootécnico das aves, este trabalho foi desenvolvido para avaliar os efeitos do probiótico composto por três tipos de bactérias (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*,) e o óleo essencial composto por ácido benzoico (83%), timol (1,9%), eugenol (1%), benzilsalicilato (0,3%) e piperina (0,1%) sobre o desempenho animal, morfometria intestinal de frangos de corte e contagem de *Escherichia coli*. Esses óleos essenciais são provenientes de plantas como o tomilho (timol), cravo (eugenol) e a pimenta preta (piperina) com capacidade de modular a microbiota intestinal e aumentar a produção de enzimas endógenas, o que pode refletir em melhoria da performance produtiva de frangos de corte.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no município de Cruz das Almas, no período de 21 de julho a 31 de agosto de 2014.

Foram utilizados 1.632 pintos de corte machos Cobb 500, com um dia de idade, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos, 8 repetições e 34 aves por unidade experimental. As aves foram pesadas, padronizadas e distribuídas em 48 boxes, cada um com comedouro tubular e bebedouro pendular individual.

Diariamente, as temperaturas e as umidades relativas mínimas e máximas foram registradas, com auxílio de termohigrômetro digital. Foram utilizadas campânulas a gás, distribuídas uniformemente, e cortinas plásticas para manter a temperatura adequada às necessidades das aves durante o período experimental.

O manejo das instalações, dos equipamentos e sanitário, adotados para a criação, foi o recomendado no manual da linhagem comercial usada. As aves receberam ração e água à vontade e foram vacinadas, no incubatório, contra as doenças de Marek, Gumboro, Bronquite Infecciosa e Newcastle.

Com a finalidade de aumentar o desafio sanitário e testar a eficácia dos tratamentos utilizados, as aves foram criadas em cama reutilizada, fornecida por uma integradora da região, os bebedouros foram lavados apenas três vezes na semana e a água foi contaminada com material da cama segundo metodologia descrita por Silva (2008).

As dietas experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, para atender as exigências nutricionais das aves em cada fase de desenvolvimento (1 a 7 dias, de 8 a 21, 22 a 34 e 35 a 41 dias de idade), de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2011) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição centesimal e níveis calculados de nutrientes das dietas basais para as fases de 1 a 7 , de 8 a 21 , de 22 a 34 e 35 a 41 dias de idade

Ingredientes	1 a 7	8 a 21	22 a 34	35 a 41
Milho	57,407	58,597	60,549	64,103
Farelo de soja	36,158	33,898	31,213	28,185
Óleo de soja	1,303	0,000	0,000	0,000
Óleo ácido de soja	0,000	3,054	4,525	4,688
Fosfato bicálcico	0,218	0,000	0,000	0,000
Farinha de carne e ossos	3,000	2,567	1,833	1,129
Calcário	0,427	0,534	0,603	0,629
Sal	0,486	0,467	0,451	0,446
Suplemento vitamínico ¹	0,050	0,050	0,040	0,040
Suplemento mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050
Cloreto de colina 60%	0,075	0,075	0,060	0,060
DL-Metionina 99%	0,388	0,332	0,311	0,288
L-Lisina HCL 78%	0,343	0,281	0,270	0,287
Anticoccidiano ³	0,030	0,030	0,030	0,030
Antioxidante ⁴	0,015	0,015	0,015	0,015
Material inerte	0,050	0,050	0,050	0,050
Valores calculados				
Proteína bruta (%)	22,400	21,200	19,800	18,400
Cálcio (%)	0,920	0,841	0,758	0,663
Fósforo disponível (%)	0,470	0,401	0,354	0,309
Energia metabolizável (kcal/kg)	2960	3050	3150	3200
Lisina (%)	1,460	1,342	1,247	1,169
Metionina + Cistina (%)	1,051	0,966	0,910	0,853
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195

¹Suplemento vitamínico contendo: Vit. A, 27.000.000 UI; Vit. D3, 8.000.000 UI; Vit. E, 100 g; Vit. K3, 7.500 mg; Vit.B1, 6.600 mg; Vit.B2, 19 g; Vit.B6, 11 g; Vit.B12, 55 mg; Niacina, 150 g; Ácido pantotênico, 35 g; Ácido fólico, 5.500 mg; Biotina, 550 mg; Selênio, 900 mg; Excipiente q.s.p.,1000 g.

²Suplemento mineral com: Ferro, 100 g; Cobre, 12 g; Manganês, 140 g; Zinco, 140 g; Iodo, 2,5 g; Excipiente q.s.p.,1000g. ³Monensina 40%. ⁴Hidroxi-butil-tolueno.

Nas dietas experimentais foram utilizados 3 tipos de aditivos: antibiótico melhorador de desempenho (Enramicina 8%), na concentração de 125 ppm, como controle positivo (CP), o probiótico composto por cepas (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) (Cylactin®- PRO), na concentração de 18 ppm, e um produto comercial (Crina Poultry Plus®- CPP) composto por ácido benzoico (83%), timol (1,9%), eugenol (1%), benzilsalicilato (0,3%) e piperina (0,1%), na concentração de 300 ppm, em substituição ao material inerte das rações. Os tratamentos utilizados foram: dieta basal sem aditivos (controle negativo-CN); dieta basal suplementada com óleos essenciais (timol, eugenol e piperina) e ácido benzoico (CPP); dieta basal com probióticos (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) (PRO), dieta basal com CPP + PRO; dieta basal com Enramicina 8% (controle positivo –CP); dieta basal com CP + CPP.

As variáveis ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar foram avaliadas para os períodos de 1 a 21, de 22 a 41 e de 1 a 41 dias de idade, enquanto o índice de mortalidade foi determinado apenas no final do experimento, aos 41 dias de idade.

As análises de morfometria intestinal foram realizadas aos 11, 27 e 41 dias de idade. Para tal, uma ave, por unidade experimental, escolhida ao acaso entre aquelas que apresentavam pesos médios do lote, foi eutanasiada por deslocamento cervical, de acordo com a metodologia de Pelicano et al. (2003), coletando-se, então, amostras de 2 cm do jejuno que foram fixadas em formalina 10%, em tampão fosfato 0,1M e PH 7,4, e enviadas ao Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Posteriormente, foram colocadas em álcool 70% para retirada do fixador, desidratadas em série crescentes de alcoóis, impregnadas e incluídas em parafina.

Dos blocos, obteve-se cortes seriados, em micrótomo semi-automático ajustado para 5µm, que foram colocados em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina eosina. Para realização das análises histométricas, as lâminas foram observadas e fotografadas em um microscópio binocular de luz LEICA ICC50 HD® acoplado a uma câmera digital, este conectado a um

computador contendo uma placa de captura de imagens (ATI) através do software de captura Leica LAS EZ®(Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA).

As análises histométricas deram-se através de medições realizadas em imagens digitais obtidas com objetiva de 10x. Foram mensuradas de cada animal: 10 alturas das vilosidades intestinais, 10 médias de larguras de vilosidades (média aritmética entre as medidas proximal, média e distal da vilosidade em relação à base das mesmas) e 10 distâncias entre as vilosidades (mensuradas na base das mesmas), seguindo recomendações de ALVARENGA et al. (2004).

A fotomicrografia foi analisada pelo programa do software Image J®. A calibração do programa foi realizada utilizando uma fotomicrografia no mesmo aumento (4x) de uma régua micrométrica de 0,01 mm LEICA (50 mm –Referência 10310345), onde 156 pixels corresponderam a 100 micrômetros. Foi realizada o cálculo da área de absorção segundo a metodologia descrita por Kisielinski et al. (2002).

Para análises microbiológicas de *Escherichia coli*, foi eutanasiada uma ave por unidade experimental, aos 11, 27 e 41 dias de idade. As aves foram escolhidas, de forma aleatória, entre as que apresentavam peso médio do lote e a eutanásia foi feita por deslocamento cervical. O consumo foi estimulado constantemente para evitar o esvaziamento do trato digestivo. Como amostras para análises microbiológicas, coletou-se intestinos inteiros de forma asséptica, usando-se sempre luva de procedimento, que foram acondicionados em sacos estéreis de uso único, lacrados, identificados e, em seguida, colocados em caixas isotérmicas e transportados para o Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia (LASAB) para aplicação das análises.

O processamento das amostras, para análise microbiológica de contagem de *E. coli*, foi realizado obedecendo-se as regras de higiene e segurança laboratoriais, mediante o uso de luvas de procedimento, em fluxo laminar horizontal, previamente esterilizado sob radiação ultravioleta (UV) por 15 minutos, e com toda vidraria e utensílios esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

Os intestinos foram fracionados em placas de petri estéreis, em seguida pesou-se 1g e acondicionou-se em tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% estéril. Então, realizou-se a diluição até 10^{-4} , o material foi plaqueado em duplicata em meio EMB (Eosina Azul de Metileno) e incubado a 35°C por 24

horas. Após este período, foi realizada a contagem das colônias e o resultado foi expresso em UFC/g (unidade formadora de colônias/grama) de intestino. As colônias sugestivas de *E. coli*, ou seja, que apresentavam tamanho médio, bordos regulares com brilho verde metálico característico e centro escuro, foram estocadas em agar nutriente e submetidas às provas bioquímicas de rotina: oxidase, catalase, e InVIC (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e citrato) para confirmação da espécie (adaptado de MERCK, 2000) .

Como procedimento estatístico, foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (GLM) para uma distribuição normal com função de ligação *identidade*, quando constatada a normalidade dos dados para as variáveis. Quando a normalidade não foi constatada utilizou-se GLM com distribuição Gama e função de ligação *log*. Para características de desempenho e morfometria intestinal foram utilizadas médias múltiplas comparadas pelo procedimento de *Bonferroni* e a contagem bacteriana total foi utilizada o teste de media Tukey-HSD. Tanto para análise microbiológica e morfometria intestinal foram considerado um arranjo fatorial para 6 tratamentos e 3 idades. Todas as variáveis estudadas foram adotadas o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura manteve-se estável durante toda a fase experimental, proporcionando conforto térmico aos animais, não interferindo no índice de mortalidade e nem permitindo que houvesse refugagem de aves do lote, proporcionando assim um desenvolvimento uniforme no plantel.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que os aditivos alternativos usados na alimentação dos frangos de corte, de 1 a 41 dias de idade, não influenciaram o consumo de ração das aves nos três intervalos estudados. O mesmo foi verificado quanto ao índice de mortalidade no mesmo período. Resultados similares foram descritos por Medeiros et al. (2009) que, ao avaliarem o uso do probiótico *Bacillus subtilis* como promotor de crescimento alternativo em substituição aos antibióticos associados colistina e avilamicina, não observaram interferências sob o consumo de ração e percentual de mortalidade dos frangos de corte entre 0 a 42 dias de idade.

Quanto ao ganho de peso, no período de 1 a 21 dias de idade, apenas as aves alimentadas com rações com CPP e com a associação entre o CP e CPP diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do CN. O mesmo não foi observado para os períodos de 22 a 41 e de 1 a 41 dias de idade. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos realizados por Boemo et al. (2012) que, ao utilizarem dietas com os mesmos óleos essenciais e o ácido benzoico, avaliando o desempenho de frangos de corte Cobb 500 no período de 1 a 21 dias de idade, observaram efeito positivo sobre o ganho de peso quando comparado com dieta sem uso de antibiótico, mas não obtiveram diferença em relação à dieta contendo o antibiótico avilamicina.

Tabela 2. Ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade nos intervalos de 1 a 21, 22 a 41 e 1 a 41 dias de idade, sob os diferentes tratamentos experimentais

Períodos	Tratamentos experimentais						P valor/ GLM	
	CN	CPP	PRO	CPP+PRO	CP	CP+CPP		
1 a 21 dias								
Ganho de peso (g)	1190,51b	1234,33a	1210,01ab	1223,95ab	1228,99ab	1235,23a	0,006	**
Consumo de ração (g)	1239,13	1207,34	1227,35	1222,72	1235,06	1248,25	0,327	
Conversão alimentar	1,04c	0,97a	1,01bc	0,99ab	1,00ab	1,01bc	0,000	***
22 a 41 dias								
Ganho de peso (g)	2074,23	2083,37	2007,56	2070,70	2078,20	2082,38	0,660	
Consumo de ração (g)	3521,59	3519,41	3655,88	3640,18	3442,33	3553,35	0,156	
Conversão alimentar (g/g)	1,69a	1,68a	1,82b	1,75ab	1,65a	1,71ab	0,001	**
1 a 41 dias								
Ganho de peso (g)	3247,44	3317,77	3217,58	3294,65	3307,20	3317,62	0,371	
Consumo de ração (g)	4740,73	4726,76	4883,23	4862,91	4677,39	4801,60	0,242	
Conversão alimentar (g/g)	1,45ab	1,42a	1,51b	1,47ab	1,41a	1,45ab	0,001	**
Mortalidade (%)	4,04	5,88	4,41	2,57	2,21	1,10	0,074	

*Médias com letras diferentes na linha indicam diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$) segundo o teste de médias *Bonferroni*.

CN (controle negativo, sem aditivos); CPP - Crina Poultry Plus®: ácido benzóico, tímol, eugenol, piperina; PRO - Cylactin®: *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*; CP (controle positivo): Enramicina 8%.

Os mesmos autores verificaram que o tratamento com Avilamicina associada aos óleos essenciais e ácido benzóico não apresentou resultados diferentes daqueles obtidos quando foram utilizadas as dietas sem e com antibiótico isoladamente e nem em relação ao tratamento com timol, eugenol, piperina associado ao ácido benzóico, o que demonstra os benefícios que os aditivos alternativos podem trazer, principalmente pela sensibilidade dos frangos de corte na fase inicial, onde as aves podem ser acometidas por problemas sanitários causando prejuízos econômicos. Esses resultados podem ser explicados nesse trabalho devido as aves nessa fase serem mais sensíveis pois não são ainda imunocompetentes, fazendo com o que o desafio nessa fase fosse maior e evidenciasse a eficiência dos produtos utilizados.

Os frangos de corte, no período de 1 a 21 dias de idade, que receberam as dietas dos tratamentos CPP, PRO + CPP e CP apresentaram conversão alimentar que não diferiram estatisticamente entre si, mas superiores quando comparado com o CN. Esses resultados coincidem com o trabalho de Weber et al (2012), que observaram que a suplementação de 300 mg/kg do CPP melhorou significativamente a conversão alimentar em relação ao CN. O tratamento PRO e a associação do CP+ CPP foram semelhantes, quando avaliados pelo teste de médias múltiplas de *Bonferroni* ($P < 0,05$), aos obtidos no CN sem o uso do antibiótico. Com isto os resultados demonstram a eficiência no uso dos aditivos estudados, os quais compõem os tratamentos CPP, CPP + PRO e CP, o que pode ser explicado pela possível melhoria na qualidade intestinal evidenciada pelo aumento da altura da vilosidade nesses tratamentos em relação ao tratamento PRO.

Os tratamentos CN, CPP, CPP + PRO, CP e CP + CPP apresentaram resultados de conversão alimentar dos frangos entre 22 a 41 dias de idade semelhantes, enquanto o tratamento PRO promoveu conversão alimentar inferior aos obtidos para os tratamentos CN, CPP e CP, mas semelhante aos dos tratamentos CPP + PRO e CP + CPP. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Henrique et al. (1998), Loddi et al. (2002), Pedroso et al. (2002), Corrêa et al. (2003), Lima et al. (2003) e Pelicano et al. (2004), que não constataram efeito da adição do probiótico sobre a conversão alimentar, quando

trabalharam com frangos de corte no período de 1 a 41 dias de idade. A ausência de resultados benéficos com o uso dos próbióticos pode ser explicada, segundo Loddi et al. (2002), pela possível diferença nas quantidades e nas características das cepas dos microorganismos utilizados, podendo assim serem utilizadas quantidades superiores em pesquisas futuras para obtenção de outros resultados.

No período de 1 a 41 dias de idade, as aves que receberam as dietas contendo os tratamentos CN, CPP, CPP + PRO, CP e CP+CPP tiveram conversão alimentar semelhantes. Já as aves que foram alimentadas com dietas contendo apenas o PRO apresentaram conversão alimentar inferior aos tratamentos CPP e CP, mas similar ao desempenho das aves que receberam os tratamentos CN, CPP + PRO e CP + CPP. A ausência de desafio na criação e a utilização de dietas com ingredientes de alta digestibilidade podem ter contribuído para que as aves expressassem seu máximo potencial genético, tornando indetectável a melhora ocasionada pela inclusão de qualquer dos aditivos. Segundo Bertechini (2006), os aditivos melhoradores de desempenho proporcionam melhores resultados em condições de desafio sanitários.

Os resultados de morfometria intestinal estão apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) para as variáveis profundidade da cripta e área de absorção ao serem avaliados segundo o teste de médias múltiplas de *Bonferroni*, no entanto a variável altura de vilosidade apresentou um efeito positivo entre todos os tratamentos em relação ao tratamento PRO, no qual esse último obteve o pior resultado, o que pode explicar através dessa análise o resultado inferior desse tratamento comparado aos outros tratamentos na conversão alimentar pois o aumento da altura da vilosidade sugere um aumento da área de superfície capaz de maior absorção dos nutrientes, apesar de nesse estudo não apresentar diferença estatística entre os tratamentos na área de absorção, mas numericamente o tratamento PRO obteve a menor área de absorção nesse estudo. Todos os tratamentos estudados com exceção do tratamento PRO, obtiveram um efeito positivo com evolução da idade de coleta em relação à altura da vilosidade, porém em relação à característica da área de absorção com a evolução da idade de coleta apenas o tratamento CPP + CP obteve um efeito positivo em relação a todos os outros tratamentos. Esse trabalho não corrobora com o trabalho de Awad, et al (2009), que obtiveram maior altura de vilosidade utilizando probiótico (*Lactobacillus sp.*) e simbiótico

que apresentavam em sua composição uma combinação de *Enterococcus faecium* e um prébiótico derivado da chicória, além de uma substância imunomoduladora derivada das algas marinhas, porém a profundidade da cripta duodenais permaneceram inalteradas no presente estudo corroborando com o nosso trabalho.

Os resultados da contagem bacteriana de *E. coli* apresentados na Tabela 4 demonstram que na coleta com 11 dias de idade não houve efeito significativo entre os tratamentos, porém aos 27 dias de idade o tratamento CPP resultou em efeito positivo, reduzindo a contagem bacteriana, quando comparado aos demais tratamentos, isso sugere que houve um efeito protetor contra a colonização por *E. coli* em frangos de corte que receberam esta dieta. Isso pode ser explicado segundo Lee et al. (2004), Fukayama et al. (2005), Santurio et al. (2007), Wang et al. (2007), que afirmaram que os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana.

Segundo Griggs e Jacob (2005), óleos essenciais de tomilho, cravo, orégano e pimenta podem ser usados para o controle de *Clostridium perfringens* na avicultura.

Tabela 3. Altura da vilosidade, profundidade da cripta, área de absorção nas coletas aos 11, 27 e 41 dias de idade, sob os diferentes tratamentos experimentais.

Variável	Tratamentos Experimentais						GLM	Int	
	CN	CPP	PRO	CPP+PRO	CP	CP+CPP			
Altura da vilosidade(μm)	1124,43a	1106,4a	978,01b	1129,71 ^a	1071,64a	1072,95a	,013	**	
Profundidade da cripta(μm)	625,88	658,17	518,06	593,21	574,11	631,60	,059	NS	
Área Absorção(μm^2)	13,27	14,12	12,81	13,64	13,80	15,28	,148	**	
Interação		CN	CPP	PRO	CPP+PRO	CP	CP+CPP		
Altura da vilosidade (μm)	11 dias	695,45a A	798,78aA	787,75aA	888,46aA	817,92aA	690,47aA	,000	,000
	27 dias	1065,7aA	1170,91abAB	1037,77aA	1113,12aAB	1077,08aAB	1139,07aB	,000	,000
	41 dias	1612,13aB	1349,5abB	1108,51bA	1387,56abB	1319,93abB	1389,3abB	,000	,000
Área Absorção(μm^2)	11 dias	9,27aA	12,28aA	10,12aA	12,2aA	11,36aA	9,83aA	,001	,001
	27 dias	14,88abA	14,82abA	14,79abA	13,19bA	14,53abA	21,15aB	,001	,001
	41 dias	15,65aA	15,25aA	13,53aA	15,53aA	15,5aA	14,87aAB	,001	,001

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças entre os tratamentos e com letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças entre as idades ($p < 0,05$) segundo o teste de médias Bonferroni. GLM utilizando efeitos fixos para tratamento e aleatório para idade sobre a AV, PC e AA. CN (controle negativo- sem antibiótico); CPP- ácido benzóico, timol, eugenol, piperina; PRO- *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*; CP- controle positivo- Enramicina 10 ppm.

Tabela 4. Variação da contagem bacteriana total (logCBT) em resposta adiferentes tratamentos e idades de coletas

Idades	Tratamentos experimentais						P valor
	CN	CPP	PRO	CPP+PRO	CP	CP+CPP	
11 dias	7,102 _{aA}	6,312 _{aA}	7,188 _{aA}	6,667 _{aA}	7,065 _{aA}	6,259 _{aA}	
27 dias	5,989 _{aB}	4,760 _{bAB}	6,097 _{aB}	5,443 _{aB}	6,347 _{aA}	5,406 _{aAB}	0,025
41 dias	5,333 _{abB}	5,805 _{abA}	5,121 _{bB}	5,452 _{abB}	6,222 _{aA}	4,965 _{bB}	

*Médias com letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças entre os tratamentos e com letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças entre as idades ($p < 0,05$) segundo o teste de médias Tukey-HSD. GLM utilizando efeitos fixos para tratamento e aleatório para idade sobre a contagem de *E. coli*, na escala logarítmica. CN (controle negativo, sem aditivos); CPP - Crina Poultry Plus®: ácido benzóico, timol, eugenol, piperina; PRO - Cylactin®: Enterococcus faecium, Bacillus subtilis and Bacilus licheniformis; CP (controle positivo): Enramicina 8%.

Mith et al. (2014) sugerem que o óleo de orégano e o carvacrol têm o potencial para mitigar os efeitos adversos causados pela expressão de genes de virulência em EHEC (*E. Coli* enterohemorrágica) O157: H7, através da utilização destas substâncias como aditivos antibacterianas naturais em alimentos como uma alternativa aos antibióticos. De acordo com Flemming (2010) os óleos essenciais quando associados aos ácidos orgânicos causam injúria na membrana celular dos microorganismos, aumentando o gasto de energia e limitando o crescimento e a multiplicação bacteriana. A associação entre óleos essenciais e ácidos orgânicos é interessante, uma vez que apresentam ações complementares sobre as células bacterianas, enquanto os ácidos orgânicos agem principalmente na dieta e na parte anterior do trato gastrointestinal, os óleos essenciais atuam na porção inferior do intestino delgado. Além disso, a combinação entre eles pode potencializar os seus efeitos no que se refere às ações antimicrobianas, ao aumentar a permeabilidade da membrana bacteriana, reduzindo a multiplicação de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Complementarmente, podem promover maior estímulo à secreção de enzimas digestivas e reduzir o desenvolvimento de fungos em rações (LANGHOUT, 2005).

Rostagno et al. (2004), relataram que uma das explicações para ausência de efeito benéfico dos aditivos alternativos em experimentos com frango de corte pode ser a falta de desafio, em decorrência do pouco uso e da boa higiene das instalações onde foram realizados os experimentos, que evidentemente não são parecidas com as condições sanitárias normalmente encontradas nos aviários comerciais. Portanto, ficou evidenciado que condições adequadas de práticas de manejo e sanitárias justificam a ausência de efeitos expressivos dos aditivos alternativos.

Visualizamos, nas análises das amostras dos animais com 41 dias de idade, que os tratamentos com PRO e CP+CPP foram os mais eficazes na redução da carga microbiana de *E. coli*, entretanto os efeitos destes não foram estatisticamente diferentes em relação ao CN, mas foram diferentes em relação ao CP. Trabalhos na literatura demonstram que o espectro de ação da enramicina apresenta uma potente ação bactericida principalmente contra bactéria Gram positiva (SHERING-PLOUGH, 2011), o que pode explicar que nesse estudo o CP não apresentou eficácia contra *E. coli*, por ser uma bactéria Gram negativa.

De acordo com os resultados obtidos neste experimento em relação ao probiótico, Jin et al. (2000) e Cao et al. (2013) verificaram o efeito protetor contra a colonização por *Escherichia coli* em frango de corte que receberam próbiotico à base de *Bacillus subtilis* e de *E. Faecium* respectivamente. Levkut et al. (2009, 2012) relataram que o *E. faecium* reduziu a quantidade cecal de *Salmonella* em frangos desafiados. Da mesma forma, outros grupos demonstraram que os probióticos, incluindo *Lactobacillus acidophilus* e *E. faecium*, reduziram concentrações de *Campylobacter jejuni* em frangos (MORISHITA et al., 1997; WILLIS e REID, 2008; GHAREEB et al., 2012). Também, Cao et al. (2013) demonstraram que dietas suplementadas com *E. faecium* aumentavam as concentrações de *Lactobacillus* cecal, com 14 e 21 dias de idade, e de bifidobactérias cecal, com 21 dias, em frangos de corte desafiados.

Provavelmente, como os resultados deste trabalho sugerem, o uso de probióticos possa aumentar a contagem de bactérias benéficas produtoras de ácido láctico e a diminuição da carga bacteriana por *E. coli*.

Houve uma diminuição da contagem de *Escherichia coli* em relação a evolução da idade de coleta para os tratamentos CN, PRO, CPP + PRO e o CP + CPP. Nos três primeiros tratamentos citados acima já foi observado um efeito significativo entre a coleta de 11 e 27 dias, sendo que o CPP na fase de coleta de 27 dias diferiu em relação a todos os outros tratamentos, inclusive em relação ao CN, isso pode sugerir que o uso desse produto até essa fase de 27 dias pode ser benéfico no controle da *E. coli*, já que essa fase é um momento de maiores desafios entéricos em frango de corte. Já em relação ao tratamento CP associado ao CPP só apresentou diferença após a coleta final de 41 dias. Essa diminuição da contagem de *E. coli* com a evolução da idade pode ser explicado, de acordo com Friedman et al. (2003) e Montassier (2009), pelo fato de que aves jovens são imunologicamente imaturas e que com avançar da idade o sistema imune se torne mais competente. O aparecimento e desenvolvimento do sistema imune depende estritamente de estímulos antigênicos produzidos na mucosa intestinal, os quais ocorrerão após o

nascimento, com a ingestão de alimentos e o estabelecimento da microbiota normal e dos microorganismos patogênicos.

5 CONCLUSÃO

O uso do CPP melhora o ganho de peso e a conversão alimentar de 1 e 21 dias de idade. Os tratamentos com PRO e com CP + CPP podem reduzir a colonização bacteriana por *E. coli*. O tratamento PRO obteve a menor altura de vilosidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I. Effect of probiotics on broilers performance. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.6, p.593-597, 2006.
- ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como promotores de crescimento. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Roca. p.11-35. 2005. 366p.
- ALLIX, E. **Promotores de crescimento para frangos de corte**. 2010. 29f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- ALVARENGA, B. O.; BELETTI, M. E.; FERNANDES, E. A.; SILVA, M. M.; CAMPOS, L. F. B; RAMOS, S. P. Efeitos de fontes alternativas de fósforo nas rações de engorda e abate sobre a morfologia intestinal de frangos de corte. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.20, n.3, p.55–59, 2004.
- ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L. LIMA, M.R; LIMA, C.B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasília**, v.1, n.3, p.69-77, 2007.
- AWAD, W. A., GHAREEB, K., ABDEL-RAHEEM, S., BOHM, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v.88, p.49-56, 2009.
- BARRETO, M.S.R.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M. PEREIRA, P.W.Z; RIZZO, P V. Plant extracts used as growth promoters in broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.10, n.2, p.109-115, 2008.
- BERCHIEIRI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N., DI FÁBIO, J. SESTI, L., ZUANAZE, M.A.F. Doenças das Aves. **FACTA –Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**. Campinas SP, 2009.
- BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora UFLA. 2006. 301p.
- BERTECHINI, A. G; HOSSAIN, S. M. Utilização de um tipo de próbiotico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. In: Conferencia Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. 1993, Santos, SP. **Anais...**Santos: Apinco, p.1. 1993.
- BOEMO, L. S. ; ROSA, A. P. ; ARISTIMUNHA, P. C. ; SCHER, A. ; GARCEZ, D.; ROSA, D. P. ; SANTOS, C. B. ; MANFIO, V. M. . Crina Poultry Plus as an alternative feed additive to antibiotic growth promoters in broiler diets. In: International Poultry Scientific Forum (SPSS), 2012, Atlanta, Ga - EUA. **Poultry Science Supplement**, 2012. p. 229-230.
- BOLELI IC, MAIORKA A, MACARI M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari M, Furlan RL, Gonzales E, editores. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funep; p.75-96. 2002.
- BONATO, M. A.; SAKOMURA, N. K.; PIVA, G. H.; BARBOSA, N. A. A.; MENDONÇA, M. O.; FERNANDES, J. B. K. Efeito de acidificantes e extratos vegetais sobre o desempenho

e qualidade de ovos de poedeiras comerciais. **ARS Veterinária**, v.24, n.3, p.186-192, 2008.

BRASIL. Ministério da agricultura. **Instrução Normativa n.13, de 30 de novembro de 2004**. Regulamento Técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, segundo boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização, constante dos anexos desta instrução normativa. Brasília; 2004.

BRESSLAU, S. Aspectos regulatórios e uso prudente dos aditivos antimicrobianos. In: VIII SEMINÁRIO DE AVES E SUÍNOS –AVESUI 2009, CONJUNTURAL, 2009, São Paulo, **Anais...**São Paulo, SP, 2009, p.59-63.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**.7.ed, Prendice-Hall, New Jersey, 1994. 909p.

BUTOLO, J. E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal, Piracicaba, 1999. **Anais...**Piracicaba: CBNA, 1999. p.85-98.

CANIBE, N.; STEIEN, S. H.; OVERLAND, M.; JENSEN, B. B. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and gastric alterations. **Journal of Animal Science**, v.79, n.8, p.2123-2133, 2001.

CAO, G. T; ZENG, X. F.; CHEN, A. G.; ZHOU, L.; ZHANG, L.; XIAO, Y. P.; YANG, C.M. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. **Poultry science**, v.92, n.11, p.2949-2955, 2013.

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN (NRC, EUA). Crean resistència los antibióticos. **Indústria Avícola**, v.46, n.3, p.42-46, 1999.

CORRÊA, G. S. S.; GOMES, A. V. C.; CORRÊA, A. B.; SALLES, A. S.; MATTOS, E. S. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p.467-473, 2003.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Journal of Applied for Poultry Research**, v.11, n.4, p.453- 463, 2002.

ERPELDING, D. L. Promotores de crescimento: ciência vs política. In: **Simpósio Internacional Sobre Nutrição de Aves**, Campinas, FACTA, 31 de agosto a 01 de setembro de 1999. p.187-197.

FARIA, D. E.; HENRIQUE, A. P. F.; FRANZOLIN NETO, R.; MEDEIROS, A. A.; JUNQUEIRA, O. M.; FARIA FILHO, D. E. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 2. Ácidos orgânicos e probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.29-39, 2009.

FERKET, P. R. Managing gut health in a world without antibiotics. In: Alltech's 17TH European middle eastern and African lecture tour, 2003, England. **Proceedings England: Alltech UK**, England, 2003.

FERREIRA, F.A.B; KUSSUKAWA,K.CK. Uso de probiotico na alimentação de frango de corte. **Biociencia Ciência & Desenvolvimento**, p.40-43 2008.

FLEMMING, J. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.41-47, 2005.

FLEMMING, J. S. Promotores de Crescimento Alternativos: Ácidos Orgânicos, Óleos Essenciais e Extratos de Ervas. 2010. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA.avicultura/nutricao/foruns/promotorescrescimentoalternativos-acidos-t394/141-p0.htm>. Acesso em: 03 fev. 2015.

FOX, S.M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. **Veterinary Medicine**, v.83, n.8, p.806-829, 1988.

FRANZO, V.S. **Considerações morfofisiológicas do intestino e do fígado de poedeiras comerciais submetidas aos diferentes programas de muda forçada**. Dissertação (Doutorado em Medicina–Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

FRIEDMAN A., BAR-SHIRA E., SKLAN D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **World Poultry Science Journal**, v.59, p.209–220, 2003

FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KATO, R. K.; MURGAS, L. D. S. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2316-2326, 2005.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: **SIMPOSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO**, 2004, Balneário Camboriú, Santa Catarina. Anais... Balneário Camboriú, 2004, p.6-28.

GARCIA, V.; GREGORI, P. C.; HERNANDEZ, F.; MEGIAS, M. D.; MADRID, J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. **Journal Applied Poultry Research**, v.16, n.4, p.555–562, 2007.

GAUTHIER, R. La Salud Intestinal: Clave de la productividad (El caso de los Ácidos Orgânicos). In: Precongreso Científico Avícola IASA, XXVII Convención ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México, 2002. **Anais eletrônicos...** [on line]. Disponível :<http://www.engormix.com/MAavicultura/nutricion/articulos/salud-intestinal-clave-productividadt518/p0.htm>. Aceso em 18 de janeiro de 2014.

GHAREEB, K.; AWAD, W. A.; MOHNL, M.; PORTA, R.; BIARNES, M.; BOHM, J.; SCHATZMAYR, G. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **Poultry Science**, v.91, p.1825-1832, 2012.

- GONZALES, E. **Aditivos para rações de aves e suínos**. Apostila, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita F°TMVZ –UNESP –Campos de Botucatu, 2006.
- GÓRNIAC, S. L.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos na Avicultura- Usos e Restrições, In: **Saúde Aviária e Doenças**, (Ed. Andreatti Filho, R. L.), p.35-40, 2007.
- GRIGGS, J. P.; JACOB J. P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, n.4, p.750–756, 2005.
- GUYNOT, M. E.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). **International Journal of Food Microbiology**, v.101, n.2, p.161-168, 2005.
- KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plant extracts. **Feed Mix –The International Journal on Feed, Nutrition and Technology –Special: Alternatives to antibiotics**. Doetinchen, v.9, n.6, p.19-24. 2000.
- KASSIE, G. A. M. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. **Pakistan Veterinary Journal**, v.29, n.4, p.169-173, 2009.
- KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JUNIOR, A., SILVA, E.N; FÁBIO, E.D. I.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2.ed. Campinas-SP: FACTA, p.837-855, 2009.
- KLUGE, H.; BROZ, J.; EDER, K. Effects of dietary benzoic acid on urinary pH and nutrient digestibility in lactating sows. **Livestock Science**, v.134 p.119–12, 2010.
- HELANDER, I.M. KALA, K.L; SANDHOLM, T. M; SMID, E.J; POL, I; GORRIS, L.G, M; WRIGHT, A.V. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.
- HENRIQUE, A. P.; FARIA, D.; FRANZOLIN, R.; ITO, D.T. Uso de probióticos e antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte. In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, p. 297-299. 1998.
- HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V.; ORENCO, J.; MEGIÁS, M. D. Influence of Two Plant Extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, v.83, n.2, p.169-174, 2004.
- IAFIGLIOLA, M. C.; MENTEN, J. F. M; RACANICCI, A. M. C.; GAIOTTO, J. B. Cobre e antibiótico como promotores de crescimento em rações para frangos de corte. **Rev. Bras. Ciência Avícola.**, v.2, n.3, 2000.
- JAMROZ D. A., WILICZKIEWICZ T., WERTELECKI T., ORDA I., SKORUPINSKA J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. **Br. Poult. Sci.**, v.46, p.485-493. 2005.

- JANG, I. S.; KO, Y.H.; KANG, S. Y.; LEE, C. Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.134, n.3, p.304–315, 2007.
- JEAUROUND, E; SCHUMANN, B.; CLUNIES, M. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v.20, suppl.1, p.394, 2002.
- JIN, L.Z., HO, T.W., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, v.53, p.351-368, 1997.
- JIN, L. Z.; MARQUARDT, R. R.; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Appl. Environ. Microbiol**, v.66, p.4200–4204, 2000.
- JUNQUEIRA O.M.; DUARTE K.F. 2005. Resultados de pesquisa com aditivos alimentares no Brasil. In: XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. **Anais ... Goiânia, GO**, 2005, p.169-182.
- KISIELINSKI, K., WILLIS, S., PRESCHER, A., KLOSTERHALFEN, B., SCHUMPELICK, V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clin Exp Med**, n.2, p131-135, 2002.
- KÜRTI, P. Microbial balance and optimal digestion in pigs. **International Pig Topics**, v.16, n.7, p.11-13, 2004.
- LANCINI, J.B. Fatores exógenos na função gastrointestinal. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA. **Fisiologia da digestão e absorção das aves**. Campinas, p.99-126. 1994.
- LANGHOUT, P. New additives for broiler chickens. **Feed Mix –The International Journal on Feed, Nutrition and Technology** –Special: Alternatives to antibiotics. Doetinchen. p.24-27. 2000.
- LANGHOUT, P. Alternativa ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2005, Santos, SP. **Anais...** Campinas: FACTA. v.1, p.21-33. 2005.
- LEE, K.W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H.J. FREHMNER, M; LOSA, R; BEYNEN, A.C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**, v.44, n.3, p.450-457, 2003.
- LEE, K. W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H. J.; WOUTERSE, H.; FREHNER, M.; BEYNEM, A. C. Essential oils in broiler nutrition. *Int. Journal Poultry Science*, v.3, n.12, p.738-752, 2004
- LEEDLE, J. Intestinal microbiology –action mechanisms. In: Simpósio sobre aditivos alternativos na nutrição animal, **Anais...** Campinas: CBNA, p. 1-14. 2000.
- LEVKUT, M., J. PUSTL, A. LAUKOVÁ, V. REVAJOVA, R. HERICH, Z. ŠEVCÍKOVÁ, V. STROMPFOVA, R. SZABOOVA, AND T. KOKINCAKOVA.

Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* 55 against *Salmonella* Enteritidis in chicks. **Acta Vet. Hung.**, v.57, p.13–24, 2009.

LEVKUT, M., V. REVAJOVÁ, A. LAUKOVÁ, Z. ŠEVCÍKOVÁ, V. SPIŠÁKOVÁ, Z. FAIXOVÁ, M. LEVKUTOVÁ, V. STROMPFOVÁ, J. PISTL, AND M. LEVKUT. Leukocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Res. Vet. Sci.**, v.93, p.195–201, 2012.

LIMA, A. C. F.; PIZAURO JR., J. M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E. B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

LIPPENS, M; HUYGHEBAERT, G.; SCICUTELLA, S. The efficacy of microencapsulated, gastro-resistant blends of essential oils and/or organic acids in broiler diets. In: **European poultry conference**, 12, 2006.

LODDI, M. M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista CFMV(Brasília)**, Brasil, v.23, p.51-56, 2001.

LODDI, M. M.; TUCCI, F. M.; HANNAS, M. I. Probióticos, mananoligossacarídeos + ácidos orgânicos em dietas de frangos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais... Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia**, [2002]. (CD-ROM).

MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E. BORGES, S.A.; BOLELI, I.C. MACARI, M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.5, 2000.

MAIORKA, A. Impacto da Saúde Intestinal na Produtividade Avícola. **V Simpósio Brasil Sul de Avicultura**, 05 a 07 de abril de 2004 –Chapecó, SC –Brasil.

MARCH, B. E. The host and its microflora: An ecological unit. **J. Anim. Sci.**, v.49, n.3, p.857-67, 1979.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220p.

MARUTA, K. Probióticos e seus benefícios. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícolas, 1993, Santos. **Anais... Santos: APINCO**, p. 203-219. 1993.

MEAD G. C. Microbial ecology of the digestive tract. In: **World's Poultry Science Congress**. CD-ROM. Montreal. Canadá: WPSA, 8p. 2000.

MEDEIROS, P. T.; PADILHA, M. T. S.; PADILHA, J. C. F.; ESPINDOLA, F.; MAGGIONI, R. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. **Revista Biotemas**, v.22, n.3, p.157-163, 2009.

MERCK (2000). Diagnóstico rápido de *E.coli* com Meios de Cultura Flurocult. 2000.

MITH, H; CLINQUART, A.; ZHIRI, A; DAUBE, G; DELCENSERIE, V. The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157: H7. **FEMS Microbiology Letters**, p. fnu021, 2014.

MITSCHE P.; ZITTLER K.; KOEHLER B.; GABLER C.; LOSA R.; ZIMERNIK I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry Science**, v.83, p.669–675, 2004.

MORISHITA, T. Y.; AYE, P. P.; HARR, B. S.; COBB, C. W.; CLIFFORD, J. R. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. **Avian Dis.**, v.41, p.850–855, 1997.

MONTASSIER, H. J. Fisiopatologia do sistema imune . In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. Doença das Aves. São Paulo: FACTA. 2009. p.391-422.

MROZ, Z.; JONGBLOED, A. W.; PARTANNEW, K. H.; VREMAN, K.; KEMME, P. A.; KOGUT, J. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. **Journal of Animal Science**, Albany, v.78, p.2622-2632, 2000.

NAMKUNG, H.; YU, H.; GONG, J.; LEESON, S. Antimicrobial activity of butyrate glycerides toward *Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfringens*. **Poultry Science**, v.90, n.10, p.2217-2222, 2011.

NITSAN, Z.; BEM-AVRAHAM, G; ZOREF, Z.; NIR, I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **Br. Poult. Sci.**, v.32, p.515-523, 1991.

NUNES, A. D. (2008). Influência do uso de aditivos alternativos a antimicrobianos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte. 111f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, M. C. D; MORAES, V. M. B. Mananoligossacarídeos e enzimas em dietas à base de milho e farelo de soja para aves. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.3, p.339-357, 2007

OVERTON, J., SHOUP, J. Fine structure of cell surface specializations in the maturing duodenal mucosa of the chick. **J. Cell Biol.**, v.21, p.75, 1964.

PARTANEN, K. H. Organic acids –their efficacy and modes of action in pigs. In: PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K. E.; LINDBERG, J. E. (ed). **Gut environment of pigs**. University press, notingham, p.201-218, 2001.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; LEONEL, L. F. R; ZEOLA, N. M. B. L; BOIAGO, M. M. Productive traits of broiler chickens fed diets containing different growth promoters. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.6, n.3, p.177-182, 2004.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; FIGUEIREDO, D. F.; BOIAGO, M. M.; CARVALHO, S. R.; BORDON, V. F. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.7, n.4, p.221-229, 2005.

- PENALVER, P., HUERTA, B.; BORGE, C.; ASTORGA, R.; ROMERO, R.; PEREA, A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. **APMIS.**, v.113, n.1, p.1-6, 2005.
- PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LONGO, F.A. Desempenho de frangos de corte recebendo ração suplementada com aditivos microbianos e criados em baterias ou em galpão convencional. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 39.,2002,Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2002]. (CD-ROM).
- PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotécnica**, v.30, n.4, p.731-738, 2006.
- PREUSS, H.G; ENCHARD,B; ENIG,M;BROOK,I; ELLIOTT,T.B.Minimum inhibitory concentration of herbal essential oil and monolarin for Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.272, n.1, p.29-4, 2005.
- RACANICCI, A.M.C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J.F.M. REGITANO-D'ARCE, M.A.B; SKIBSTED, L.H Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in precooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research Technology**, v.218, p.521-524, 2004.
- RACANICCI, A.M.C.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L.H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **European Food Research Technology**, v.227, p.255-260, 2008.
- REVOLLEDO, L. Estudo da resposta imune, da colonização e invasão por *Salmonella entérica subsp enterica* sorotipo Typhimurium Nalr em frangos de corte, tratados com glucano, probióticos e produtos de exclusão competitiva. **Tese (doutorado)** - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia. 2005.
- RIBEIRO, R. P.; FLEMMING, J. S.; BACILA, A. R. Uso de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), parede celular de leveduras (SSCW), ácidos orgânicos e avilamicina na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.3, p.210-217, 2008.
- RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, n.82, n.4, p.632-639, 2003.
- ROSTAGNO, H. S. ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F. de; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. de T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Ed. 3. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 252p. 2011.
- ROSTAGNO, H. S.; DIONIZIO, M. A.; ALBINO, L. F. T. Perspectivas da nutrição de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. 17p. (CD-ROM).

RUTZ, F.; LIMA, J. M. M. O Uso de Antimicrobianos como Promotores de Crescimento no Brasil. Congresso da ABRAVES, Associação Brasileira dos Especialistas em Suínos. X. In: **Anais...** Porto Alegre/ RS. p. 68-77. Outubro 2001.

RUTZ, F.; FERKET, P. R.; SANTOS, A. A. Antimicrobianos nas rações deaves e suínos. In: **Simpósios da reunião anual da sbz**, 43, 2006. JoãoPessoa–PB. Anais... p. 321-354. 2006.

SALANITRO, J. P.; BLAKE, I. G.; MUIRHEAD, P. A.; MAGLIO, M.; GOODMAN, J. R. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.35, n.4, p.782-790, 1978.

SANTANA, E. S.; MENDES, F. R.; BARNABÉ, A. C. S.; OLIVEIRA, F. H.; ANDRADE, M. A. Uso de Produtos Alternativos aos Antimicrobianos na Avicultura. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.13; 2011.

SANTOS, J. R. G.; DE LOS. e TURNES, C. G. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v.35, n.3, 2005.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.790-795, 2005.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POSSATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de oregano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

SAXELIN, M.; TYNKKYNNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VOS, W. M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current opinion in Biotechnology**, v.16, n.2, p.204-211, 2005.

SCHERING-PLOUGH, S. A. 2011. **ENRADIN*** F80. Disponível em <http://www.medicamentos.com.mx>.

SHUNYING, Z., YANG, Y., HUAI DONG, Y., YUE, Y., GUOLIN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Chrysanthemum indicum. **J. Ethnopharmacol**, v.96, n.1, p.151–158, 2005.

SILVA D. A, E. N. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, Campinas. **Anais...**Campinas: FACTA, v.2. p. 241-251. 2000.

SILVA, V. K.; SILVA, J. D. T.; GRAVENA, R. A. MARQUES, R. H.; HADA, F. H., MORAES, V. M. B. Desempenho de frangos decorte de 1 a 21 dias de idade alimentados com rações contendo extrato de leveduras e prebiótico e criados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.4, 2009.

SILVA, C. R. **Uso de probiótico em rações de frangos de corte: Desempenho e digestibilidade da energia metabolizável**. Dissertação UFV, Viçosa.77p. 2008.

SINGER, RANDALL S.; HOFACRE, CHARLES L. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. **Avian diseases**, v.50, n.2, p.161-172, 2006.

SMITH, H. W. Clinical problems of preventive medicine. **World's Poult.Sci. J.**, v.31, n.2, p.104-15, 1975.

SNYDER, C. H. **The extraordinary chemistry of ordinary things**.4. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 680 p. 2003.

SOARES, L. L. P. Restrições e uso de aditivos promotores de crescimento em raças de aves: Visão do fabricante. In Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1996, Paineis...Curitiba: **FACTA**, 210 p. p. 27-36. 1996.

SOUZA, A. V. C. de. **Alternativas ao uso de promotores de crescimento em avicultura**. 2010. Disponível em: www.polinutri.com.br . Acesso em 14 de janeiro de 2015.

STRATFORD, M.; PLUMRIDGE, A.; NEBE-VON-CARON, G.; ARCHER, D. B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 37-43, 2009.

SUZUKI, O. H.; FLEMMING, J. S.; SILVA, M. E. T. Uso de óleos essenciais na alimentação de leitões. **Rev. Acad., Cienc. Agrar.Ambient.**, Curitiba, v.6, n.4, p.519- 526, 2008.

SKLAN, D. Development of defense mechanisms in the digestive tract of the chick. **J.Appl.Poult.Res.**, v.14, p.437-443, 2005.

TAKO, E.; FERKET, P. R.; UNI, Z. Effect of in ovo feeding of carbohydrates and β -hydroxy- β -methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v.83, n.12, p.2023-2028, 2004.

TOLEDO, G. S. P. de.; COSTA, P. T. C.; SILVA, L. P. da.; PINTO, D.; FERREIRA, P.; POLETTI, C. J. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1760-1764, 2007.

TRAESEL, C.K. WOLKMER, P; SCHMIDT, C.; SILVA, C.B; PAIM, F.C; ROSA, A.P; ALVES, S.H; SANTURIO, J.M; LOPES, S.T.A. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. **Comparative Clinical Pathology**, In Press, 2010. Disponível em: Acesso em: 09 fev. 2015. doi: 10.1007/s00580-010-1018-1.

TUCCI, F. M. Efeitos da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a renovação celular da mucosa intestinal, enzimas digestivas e desempenho. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

UBABEF, União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual. 2014**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>. Acesso em 1 de dezembro 2014.

VIOLA, E.S. **Uso de acidificantes em dietas de frangos de corte: resíduos no trato digestivo e efeitos sobre o desempenho animal e morfologia intestinal**. Tese

(Doutorado) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 196 f. 2006.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.1097-1104, 2007 (supl.).

WEBER, G. M.; MICHALCZVK, M.; HUYGHEBAERT, G.; JUIN, H.; KWAKERNAAK, C.; GRACIA, M.I. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on performance of broiler chickens as revealed by a meta-analysis of 4 growth trials in various locations. **Poultry science**, v.91, n.11, p.2820-2828, 2012.

WANG, C. Y.; WANG, S.Y.; YIN, J.; PARRY, J.; YU, L. L. Enhancing antioxidant, antiproliferation, and free radical scavenging activities in strawberries with essential oils. **J. Agric. Food Chem**, v.55, n.16, p.6527–6532, 2007.

WEBER, G.M., MICHALCZUK, M., HUYGHEBAERT, G., JUIN, H., KWAKERNAAK C., GRACIA M.I. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on performance of broiler chickens as revealed by a meta-analysis of 4 growth trials in various locations. **Poultry Science**. v.91, p.2820–2828, 2012.

WILLIS, W. L.; REID, L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. **Poultry Science**, v.87, p.606–611, 2008.

WHO –WORD HEALTH ORGANIZATION. The medical impact of antimicrobial use in farm animals. WHO/EMC/ZOO/97.4, **Report of a WHO Meeting**, Berlim, Germany, 13-14 October, 1997. p.1-24. <http://www.who.int/emc.html>.

CAPÍTULO 2

DESEMPENHO, MORFOMETRIA E CONTAGEM BACTERIANA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES ADITIVOS ALTERNATIVOS MELHORADORES DE DESEMPENHO.

¹Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico Revista Brasileira de Ciência Avícola.
Submetido em 10 de dezembro de 2015

Desempenho, morfometria e contagem bacteriana intestinal de frangos de corte alimentados com diferentes aditivos alternativos melhoradores de desempenho

Caroline Oliveira Mendes^{1*}, Ricardo Duarte Abreu², Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos², Haiala Cajazeiras Coelho¹, Anilma Sampaio Cardoso³, Priscilla Maria Cavalcante Rocha⁴, Anselmo Lino dos Santos¹, Naiara Araújo de Jesus⁵

¹Alunos de pós-graduação – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – UFRB.

²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Cruz das Almas, BA.

³Alunos de pós-graduação – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – UESC

⁴Alunos de pós-graduação – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – UFRPE

⁵Alunos de graduação – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – UFRB.

*Autor para correspondência: lolymendes@hotmail.com

RESUMO: Avaliou-se os efeitos da suplementação com diferentes aditivos sobre as características de desempenho (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade), morfometria intestinal e contagem bacteriana total das cepas de *Escherichia coli*. Foram utilizados 1.632 pintos de corte machos da linhagem Cobb500, de um dia de idade, num delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por 6 tratamentos e 8 repetições, com 34 aves por unidade experimental. O período experimental de 41 dias foi subdividido em quatro fases de avaliação: aos 7, 21, 35 e 41 dias. A ração experimental foi à base de milho e farelo de soja e suplementada com probiótico- PRO (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) e óleos essenciais (timol, eugenol e piperina) associados ao ácido benzóico (CPP) comparando com a Enramicina (EN). Para as variáveis consumo de ração e mortalidade não foram observados efeitos dos tratamentos durante todo o período experimental. Não houve efeito da adição de qualquer dos aditivos sobre a profundidade da cripta e área de absorção no período de 1 a 41 dias de idade, porém, o tratamento PRO obteve a menor altura da vilosidade em relação a todos

os outros tratamentos. Para a variável contagem bacteriana total (*E.coli*), houve uma diminuição acentuada em todo período experimental, exceto para as aves que receberam a dieta com EN que obteve a maior contagem bacteriana. Na coleta aos 27 dias o tratamento com CPP diferiu de todos os outros tratamentos. A utilização do CPP melhora o ganho de peso e a conversão alimentar de 1 a 21 dias de idade, demonstrando assim sua eficácia.

Palavras-chave: ácido orgânico, microbiota intestinal, óleo essencial, probiótico

Performance, morphometry and intestinal bacterial count of broilers fed with different enhancers alternative additives performance

Abstract: We evaluated the effects of supplementation with different additives on the performance characteristics (weight gain, feed intake, feed conversion and mortality), intestinal morphology and total bacterial count of *Escherichia coli*. They used 1,632 broiler chicks Cobb500 lineage, one day old, in a completely randomized design, consisting of 6 treatments and 8 repetitions, with 34 birds each. The trial period of 41 days was divided into four stages of evaluation: at 7, 21, 35 and 41 days. The experimental feed was based on corn and soybean meal and supplemented with probiotic-PRO (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) and essential oils (thymol, eugenol and piperine) associated with benzoic acid (CPP) compared to the enramycin (EN). For the feed intake and mortality were observed effects of the treatments throughout the experimental period. There was no effect of adding any of the additives on crypt depth and absorption area in the period from 1 to 41 days of age, however, the PRO treatment showed the lowest villus height in relation to all other treatments. For the variable total bacterial count (*E.coli*) there was a marked decrease in all experimental period, except for the birds fed the diet with EN that had the highest bacterial counts. In the collection to 27 days treatment with CPP differed from all other treatments. The use of CPP improved weight gain and feed conversion from 1 to 21 days of age, demonstrating its efficacy.

Keywords: organic acid, intestinal microbiota, essential oils, probiotics

INTRODUÇÃO

A busca por vias de substituição ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento nas rações de frangos de corte resultou das crescentes pressões legislativas de países que importam produtos de origem animal, como a Comunidade Européia (Langhout, 2005). Assim, diversos aditivos funcionais são produzidos por empresas da área de nutrição animal para substituí-los, tais como: prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais (Jones e Ricke, 2003; Godoi et al., 2008).

O uso dos probióticos na alimentação animal baseia-se na substituição da microbiota intestinal normal. Um exemplo é o uso de *Lactobacillus sp.* para substituir *Escherichia coli*, o que melhora o desempenho, saúde e a digestão dos alimentos, e aumenta a resistência à colonização por agentes patogênicos (Dale, 1992). Por outro lado, os benefícios de ácidos como aditivos são: reduzir o pH gástrico e intestinal, estimular a secreção e aumentar a atividade de enzimas pancreáticas, diminuir a capacidade de aderência de bactérias com fímbria à parede intestinal, melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal e a palatabilidade das rações, e alterar o metabolismo intermediário, além de fornecer energia com baixo incremento calórico (Langhout, 2005; Bertechini, 2006; Ribeiro, 2008). Os efeitos positivos dos extratos vegetais na nutrição animal devem-se aos seus princípios ativos, presentes em todas as partes ou em áreas específicas das plantas (Kamel, 2000). Devido às suas propriedades antimicrobianas, passaram a ser estudados, também, para uso na alimentação animal (Martins et al., 2000; Lee et al., 2004; Fukayama et al., 2005; Santurio et al., 2007; Wang et al., 2007).

A escassez de dados sobre os benefícios do uso de aditivos alternativos levou ao desenvolvimento deste trabalho, estabelecendo-se a hipótese de que tais aditivos, isoladamente ou associados, podem proporcionar melhor desempenho, integridade intestinal e absorção, e que são eficazes no controle da *E. coli* em frangos de corte. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do uso de diferentes aditivos comerciais em dietas de frangos de corte de 1 a 41 dias de idade sobre o desempenho zootécnico, morfometria e contagem bacteriana total de *E. coli* intestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no município de Cruz das Almas, no período de 21 de julho a 31 de agosto de 2014. Foram utilizados 1.632 pintos de corte machos Cobb 500, com um dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos, 8 repetições e 34 aves por unidade experimental. Estas foram pesadas, padronizadas e distribuídas em 48 boxes, cada um com comedouros tubular e bebedouros pendular individual.

Diariamente, as temperaturas e umidades relativas mínimas e máximas foram registradas com auxílio de termohigrômetro digital. Foram utilizadas campânulas a gás, distribuídas uniformemente, e cortinas plásticas para manter a temperatura adequada às necessidades das aves durante o período experimental. O manejo das instalações, dos equipamentos e sanitário, adotados para a criação, foi o recomendado no manual da linhagem comercial usada. As aves receberam ração e água à vontade e foram vacinadas no incubatório contra as doenças de Marek, Gumboro, Bronquite Infecciosa e Newcastle.

Com a finalidade de se aumentar o desafio sanitário e testar a eficácia dos tratamentos utilizados, as aves foram criadas em cama reutilizada, os bebedouros foram lavados apenas três vezes na semana e a água foi contaminada com material da cama segundo metodologia descrita por Silva (2008).

As dietas experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, para atender as exigências nutricionais das aves em cada fase de desenvolvimento (1 a 7, 8 a 21, 22 a 34 e 35 a 41 dias de idade), conforme recomendações de Rostagno et al. (2011) (Tab. 1).

Foram usados 3 tipos de aditivos: antibiótico melhorador de desempenho Enramicina (EN) 8%, 125 ppm, probiótico composto por cepas (*Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) (Cylactin® - PRO), 18 ppm, e um produto comercial (Crina Poultry Plus® - CPP) composto por ácido benzoico (83%), timol (1,9%), eugenol (1%), benzilsalicilato (0,3%) e piperina (0,1%), 300 ppm, em substituição ao material inerte das rações.

Tabela 1. Composição centesimal e níveis calculados de nutrientes das dietas basais para as fases de 1 a 7 , de 8 a 21 , de 22 a 34 e de 35 a 41 dias de idade

Ingredientes	1 a 7	8 a 21	22 a 34	35 a 41
Milho	57,407	58,597	60,549	64,103
Farelo de soja	36,158	33,898	31,213	28,185
Óleo de soja	1,303	0,000	0,000	0,000
Óleo ácido de soja	0,000	3,054	4,525	4,688
Fosfato bicálcico	0,218	0,000	0,000	0,000
Farinha de carne e ossos	3,000	2,567	1,833	1,129
Calcário	0,427	0,534	0,603	0,629
Sal	0,486	0,467	0,451	0,446
Suplemento vitamínico ¹	0,050	0,050	0,040	0,040
Suplemento mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050
Cloreto de colina 60%	0,075	0,075	0,060	0,060
DL-Metionina 99%	0,388	0,332	0,311	0,288
L-Lisina HCL 78%	0,343	0,281	0,270	0,287
Anticoccidiano ³	0,030	0,030	0,030	0,030
Antioxidante ⁴	0,015	0,015	0,015	0,015
Material inerte	0,050	0,050	0,050	0,050
Valores calculados				
Proteína bruta (%)	22,400	21,200	19,800	18,400
Cálcio (%)	0,920	0,841	0,758	0,663
Fósforo disponível (%)	0,470	0,401	0,354	0,309
Energia metabolizável (kcal/kg)	2960	3050	3150	3200
Lisina (%)	1,460	1,342	1,247	1,169
Metionina + cistina (%)	1,051	0,966	0,910	0,853
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195

¹Suplemento vitamínico contendo: Vit. A, 27.000.000 UI; Vit. D3, 8.000.000 UI; Vit. E, 100 g; Vit. K3, 7.500 mg; Vit.B1, 6.600 mg; Vit.B2, 19 g; Vit.B6, 11 g; Vit.B12, 55 mg; Niacina, 150 g; Ácido pantotênico, 35 g; Ácido fólico, 5.500 mg; Biotina, 550 mg; Selênio, 900 mg; Excipiente q.s.p.,1000 g.

²Suplemento mineral com: Ferro, 100 g; Cobre, 12 g; Manganês, 140 g; Zinco, 140 g; Iodo, 2,5 g; Excipiente q.s.p.,1000g.

³Monensina 40%. ⁴Hidroxi-butílo-tolueno.

Os tratamentos utilizados foram: dieta basal sem aditivos (controle negativo - CN); dieta basal suplementada com CPP; dieta basal suplementada com PRO; dieta basal com CPP + PRO; dieta basal com EN e dieta basal com EN + CPP.

Variáveis ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar foram avaliadas para os períodos de 1 a 21, de 22 a 41 e de 1 a 41 dias de idade, enquanto o índice de mortalidade foi determinado apenas no final do experimento, aos 41 dias de idade. O procedimento de eutanásia dos animais seguiu a diretrizes do CONCEA/CRMV. As análises de morfometria intestinal foram realizadas aos 11, 27 e 41 dias de idade. Para tal, uma ave, por unidade experimental, escolhida ao acaso entre aquelas que apresentavam pesos médios do lote, foi eutanasiada por deslocamento cervical, segundo metodologia de Pelicano et al. (2003), colhendo-se, então, amostras de 2 cm do jejuno que foram fixadas em formalina 10%, em tampão fosfato 0,1M e PH 7,4, e enviadas ao Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Posteriormente, foram colocadas em álcool 70% para retirada do fixador, desidratadas em séries crescentes de alcoóis, impregnadas e incluídas em parafina.

Dos blocos, obteve-se cortes seriados em micrótomo semi-automático a 5 μ m, que foram colocados em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Para realização das análises histométricas, as lâminas foram observadas e fotografadas em um microscópio binocular de luz acoplado a uma câmera digital, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagens. As análises histométricas deram-se através de medições realizadas em imagens digitais obtidas com objetiva de 10x. Foram mensuradas de cada animal: 10 alturas das vilosidades intestinais, 10 médias de larguras de vilosidades (média aritmética entre as medidas proximal, média e distal da vilosidade em relação à base das mesmas) e 10 distâncias entre as vilosidades (mensuradas na base das mesmas), seguindo recomendações de Alvarenga et al. (2004).

A fotomicrografia foi analisada pelo programa do software Image J®. A calibração do programa foi realizada utilizando uma fotomicrografia no mesmo aumento (4x) de uma régua micrométrica de 0,01 mm LEICA (50 mm –Referência 10310345), onde 156 pixels corresponderam a 100

micrômetros. Foi feito cálculo da área de absorção segundo a metodologia descrita por Kisielinski et al. (2002).

Para análises microbiológicas de *Escherichia coli*, após estímulo constantemente do consumo, para evitar o esvaziamento do trato digestivo, foi eutanasiada uma ave, por unidade experimental, escolhida aleatoriamente entre as que apresentavam peso médio do lote, aos 11, 27 e 41 dias de idade através de deslocamento cervical. Os Intestinos inteiros foram colhidos assepticamente, usando-se sempre luva de procedimento, acondicionados em sacos estéreis de uso único, lacrados, identificados e, em seguida, colocados em caixas isotérmicas e transportados para o Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia. O processamento das amostras foi realizado obedecendo-se as regras de higiene e segurança laboratoriais, mediante o uso de luvas de procedimento, em fluxo laminar horizontal, previamente esterilizado sob radiação ultravioleta e com toda vidraria e utensílios esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

Os intestinos foram fracionados em placas de petri estéreis, em seguida pesou-se 1g e acondicionou-se em tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% estéril. Então, realizou-se a diluição até 10^{-4} , o material foi plaqueado em duplicata em meio EMB (Eosina Azul de Metileno) e incubado a 35°C por 24 horas. Após este período, fez-se contagem das colônias e o resultado foi expresso em UFC/g (unidade formadora de colônias/grama) de intestino. As colônias sugestivas de *E. Coli* foram estocadas em agar nutriente e submetidas às provas bioquímicas de rotina: oxidase, catalase, e InVIC (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e citrato) para confirmação da espécie (adaptado de MERCK, 2000).

Para análises estatísticas, foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (GLM) para distribuição normal com função de ligação *identidade*, quando constatada a normalidade dos dados para as variáveis. Quando a normalidade não foi constatada utilizou-se GLM com distribuição Gama e função de ligação *log*. Para características de desempenho e morfometria intestinal foram utilizadas médias múltiplas comparadas pelo procedimento de *Bonferroni* e a contagem bacteriana total foi utilizada o teste de media Tukey-HSD. Tanto para análise microbiológica e morfometria

intestinal foram considerado um arranjo fatorial para 6 tratamentos e 3 idades. Para todas as variáveis estudadas foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura manteve-se estável durante toda a fase experimental. Conseqüentemente houve conforto térmico aos animais, sem interferência no índice de mortalidade e impedimento da refugagem de aves do lote, o que proporcionou um desenvolvimento uniforme no plantel.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que os aditivos alternativos usados na alimentação dos frangos de corte de 1 a 41 dias de idade não influenciaram o consumo de ração nos três intervalos estudados.

Tabela 2. Ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade nos intervalos de 1 a 21, 22 a 41 e 1 a 41 dias de idade, sob diferentes tratamentos experimentais

Períodos	Tratamentos experimentais						P valor/ GLM	
	CN	CPP	PRO	CPP+PRO	EN	EN+CPP		
1 a 21 dias								
Ganho de peso (g)	1190,51b	1234,33a	1210,01ab	1223,95ab	1228,99ab	1235,23a	0,006	**
Consumo de ração (g)	1239,13	1207,34	1227,35	1222,72	1235,06	1248,25	0,327	
Conversão alimentar	1,04c	0,97a	1,01bc	0,99ab	1,00ab	1,01bc	0,000	***
22 a 41 dias								
Ganho de peso (g)	2074,23	2083,37	2007,56	2070,70	2078,20	2082,38	0,660	
Consumo de ração (g)	3521,59	3519,41	3655,88	3640,18	3442,33	3553,35	0,156	
Conversão alimentar (g/g)	1,69a	1,68a	1,82b	1,75ab	1,65a	1,71ab	0,001	**
1 a 41 dias								
Ganho de peso (g)	3247,44	3317,77	3217,58	3294,65	3307,20	3317,62	0,371	
Consumo de ração (g)	4740,73	4726,76	4883,23	4862,91	4677,39	4801,60	0,242	
Conversão alimentar (g/g)	1,45ab	1,42a	1,51b	1,47ab	1,41a	1,45ab	0,001	**
Mortalidade (%)	4,04	5,88	4,41	2,57	2,21	1,10	0,074	

*Médias com letras diferentes na linha indicam diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$) segundo o teste de médias *Bonferroni*.

CN (controle negativo, sem aditivos); CPP - Crina Poultry Plus®: ácido benzóico, timol, eugenol, piperina; PRO - Cylactin®: Enterococcus faecium, Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis; CP (controle positivo): Enramicina 8%.

O mesmo foi verificado quanto ao índice de mortalidade no mesmo período. Resultados similares foram descritos por Medeiros et al. (2009) ao avaliarem o uso do probiótico *Bacillus subtilis* como promotor de crescimento alternativo em substituição aos antibióticos associados a colistina e avilamicina na alimentação de frangos de corte entre 0 a 42 dias de idade.

Quanto ao ganho de peso, no período de 1 a 21 dias de idade, apenas as aves alimentadas com rações com CPP e com a associação entre o EN e CPP diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do CN. O mesmo não foi observado para os períodos de 22 a 41 e de 1 a 41 dias de idade. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos realizados por Boemo et al. (2012) que, ao utilizarem dietas com os mesmos óleos essenciais e o ácido benzóico, avaliando o desempenho de frangos de corte Cobb 500 no período de 1 a 21 dias de idade, observaram efeito positivo sobre o ganho de peso quando comparado com dieta sem uso de antibiótico, mas não obtiveram diferença em relação à dieta contendo o antibiótico avilamicina.

Os mesmos autores verificaram que o tratamento com avilamicina associada aos óleos essenciais e ácido benzóico não apresentou resultados diferentes daqueles obtidos quando foram utilizadas as dietas sem e com antibiótico isoladamente e nem em relação ao tratamento com timol, eugenol, piperina associado ao ácido benzóico, o que demonstra os benefícios que os aditivos alternativos podem trazer, principalmente pela sensibilidade dos frangos de corte na fase inicial, onde as aves podem ser acometidas por problemas sanitários causando prejuízos econômicos. Esses resultados podem ser explicados nesse trabalho devido à não imunocompetência das aves nessa fase, aumentando o desafio nessa fase e levando a evidência da eficiência dos produtos utilizados.

Os frangos de corte, no período de 1 a 21 dias de idade, que receberam as dietas dos tratamentos CPP, PRO + CPP e EN apresentaram conversão alimentar que não diferiram estatisticamente entre si, mas superiores quando comparado ao CN. Esses resultados coincidem com o trabalho de Weber et al (2012), que observaram que a suplementação de 300 mg/kg do CPP melhorou significativamente a conversão alimentar em relação ao CN. O tratamento PRO e a associação do EN + CPP foram semelhantes, quando avaliados pelo teste de médias múltiplas de *Bonferroni*

($P < 0,05$), aos obtidos no CN sem o uso do antibiótico. Assim os resultados demonstram a eficiência no uso dos aditivos estudados, os quais compõem os tratamentos CPP, CPP + PRO e EN, explicado pela possível melhoria na qualidade intestinal evidenciada pelo aumento da altura da vilosidade nesses tratamentos em relação ao tratamento PRO.

Os tratamentos CN, CPP, CPP + PRO, EN e EN + CPP apresentaram resultados de conversão alimentar dos frangos entre 22 a 41 dias de idade semelhantes, enquanto o tratamento PRO promoveu conversão alimentar inferior aos obtidos para os tratamentos CN, CPP e EN, mas semelhante aos dos tratamentos CPP + PRO e EN + CPP. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Henrique et al. (1998), Loddi et al. (2002), Pedroso et al. (2002), Corrêa et al. (2003), Lima et al. (2003) e Pelicano et al. (2004), que não constataram efeito da adição do probiótico sobre a conversão alimentar, quando trabalharam com frangos de corte no período de 1 a 41 dias de idade. A ausência de resultados benéficos com o uso dos próbióticos pode ser explicada, segundo Loddi et al. (2002), pela possível diferença nas quantidades e nas características das cepas dos microorganismos utilizados, podendo assim serem utilizadas quantidades superiores em pesquisas futuras para obtenção de outros resultados.

No período de 1 a 41 dias de idade, as aves que receberam as dietas contendo os tratamentos CN, CPP, CPP + PRO, EN e EN + CPP tiveram conversão alimentar semelhantes. Já as aves que foram alimentadas com dietas contendo apenas o PRO apresentaram conversão alimentar inferior aos tratamentos CPP e EN, mas similar ao desempenho das aves que receberam os tratamentos CN, CPP + PRO e EN + CPP. A ausência de desafio na criação e a utilização de dietas com ingredientes de alta digestibilidade podem ter contribuído para que as aves expressassem seu máximo potencial genético, tornando indetectável a melhora ocasionada pela inclusão de qualquer dos aditivos. Segundo Bertechini (2006), os aditivos melhoradores de desempenho proporcionam melhores resultados em condições de desafio sanitários.

Os resultados de morfometria intestinal estão apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) para as variáveis profundidade da cripta e

área de absorção ao serem avaliados segundo o teste de médias múltiplas de *Bonferroni*, no entanto a variável altura de vilosidade apresentou um efeito positivo entre todos os tratamentos em relação ao tratamento PRO, no qual esse último obteve o pior resultado, o que pode explicar através dessa análise o resultado inferior desse tratamento comparado aos outros tratamentos na conversão alimentar pois o aumento da altura da vilosidade sugere um aumento da área de superfície capaz de maior absorção dos nutrientes, apesar de nesse estudo não apresentar diferença estatística entre os tratamentos na área de absorção, mas numericamente o tratamento PRO obteve a menor área de absorção nesse estudo.

Todos os tratamentos estudados com exceção do tratamento PRO, obtiveram um efeito positivo com evolução da idade de coleta em relação à altura da vilosidade, porém em relação à característica da área de absorção com a evolução da idade de coleta apenas o tratamento CPP + EN obteve um efeito positivo em relação a todos os outros tratamentos. Esse trabalho não corroboram com o trabalho de Awad et al. (2009), que obtiveram maior altura de vilosidade utilizando probiótico (*Lactobacillus sp.*) e simbiótico que apresentavam em sua composição uma combinação de *Enterococcus faecium* e um prébiótico derivado da chicória, além de uma substância imunomoduladora derivada da algas marinhas, porém a profundidade da cripta duodenais permaneceram inalteradas no presente estudo corroborando com o nosso trabalho.

Tabela 3. Altura da vilosidade, profundidade da cripta, área de absorção nas coletas aos 11, 27 e 41 dias de idade, sob os diferentes tratamentos experimentais

Variável	Tratamentos Experimentais							GLM	Int	
	CN	CPP	PRO	CPP+PRO	EM	EN+CPP				
Altura da vilosidade(μm)	1124,43a	1106,4a	978,01b	1129,71a	1071,64a	1072,95a	0,013	**		
Profundidade da cripta(μm)	625,88	658,17	518,06	593,21	574,11	631,6	0,059	NS		
Área de absorção(μm^2)	13,27	14,12	12,81	13,64	13,8	15,28	0,148	**		
Interação	Idade	Tratamentos Experimentais							GLM	Int
		CN	CPP	PRO	CPP+PRO	EM	EN+CPP			
Altura da vilosidade (μm)	11 dias	695,45a A	798,78aA	787,75aA	888,46aA	817,92aA	690,47aA	0	0	
	27 dias	1065,7aA	1170,91abAB	1037,77aA	1113,12aAB	1077,08aAB	1139,07aB	0	0	
	41 dias	1612,13aB	1349,5abB	1108,51bA	1387,56abB	1319,93abB	1389,3abB	0	0	
Área de absorção(μm^2)	11 dias	9,27aA	12,28aA	10,12aA	12,2aA	11,36aA	9,83aA	0,001	0,001	
	27 dias	14,88abA	14,82abA	14,79abA	13,19bA	14,53abA	21,15aB	0,001	0,001	
	41 dias	15,65aA	15,25aA	13,53aA	15,53aA	15,5aA	14,87aAB	0,001	0,001	

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças entre os tratamentos e com letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças entre idades ($P < 0,05$) segundo o teste de médias Bonferroni. GLM utilizando efeitos fixos para tratamento aleatório para idade sobre a AV, PC e AA. CN - Controle Negativo, sem aditivos; CPP - ácido benzoico, timol, eugenol, piperina; PRO - Enterococcus faecium, Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis; EN - enramicina 10 ppm.

Os resultados da contagem bacteriana de *E. coli* apresentados na Tabela 4 demonstram que na coleta com 11 dias de idade não houve efeito significativo entre os tratamentos, porém aos 27 dias de idade o tratamento CPP resultou em efeito positivo, reduzindo a contagem bacteriana, quando comparado aos demais tratamentos, isso sugere que houve um efeito protetor contra a colonização por *E. coli* em frangos de corte que receberam esta dieta. Isso pode ser explicado segundo Lee et al. (2004), Fukayama et al. (2005), Santurio et al. (2007), Wang et al. (2007), que afirmaram que os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana.

Tabela 4. Variação da contagem bacteriana total (logCBT) em resposta adiferentes tratamentos e idades de coletas

Idades	Tratamentos experimentais						P valor
	CN	CPP	PRO	CPP+PRO	EN	EN+CPP	
11 dias	7,102 _{aA}	6,312 _{aA}	7,188 _{aA}	6,667 _{aA}	7,065 _{aA}	6,259 _{aA}	
27 dias	5,989 _{aB}	4,760 _{bAB}	6,097 _{aB}	5,443 _{aB}	6,347 _{aA}	5,406 _{aAB}	0,025
41 dias	5,333 _{abB}	5,805 _{abA}	5,121 _{bB}	5,452 _{abB}	6,222 _{aA}	4,965 _{bB}	

*Médias com letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças entre os tratamentos e com letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças entre as idades ($p < 0,05$) segundo o teste de médias Tukey-HSD. GLM utilizando efeitos fixos para tratamento e aleatório para idade sobre a contagem de *E. coli*, na escala logarítmica.

CN (controle negativo, sem aditivos); CPP - Crina Poultry Plus®: ácido benzóico, timol, eugenol, piperina; PRO - Cylactin®: *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*; EN: Enramicina 8%.

Segundo Griggs e Jacob (2005), óleos essenciais de tomilho, cravo, orégano e pimenta podem ser usados para o controle de *Clostridium perfringens* na avicultura. Mith et al. (2014) sugerem que o óleo de orégano e o carvacrol têm o potencial para mitigar os efeitos adversos causados pela expressão de genes de virulência em EHEC (*E. Coli* enterohemorrágica) O157: H7, através da utilização destas substâncias como aditivos

antibacterianas naturais em alimentos como uma alternativa aos antibióticos. De acordo com Flemming (2010) os óleos essenciais quando associados aos ácidos orgânicos causam injúria na membrana celular dos microorganismos, aumentando o gasto de energia e limitando o crescimento e a multiplicação bacteriana. A associação entre óleos essenciais e ácidos orgânicos é interessante, uma vez que apresentam ações complementares sobre as células bacterianas, enquanto os ácidos orgânicos agem principalmente na dieta e na parte anterior do trato gastrointestinal, os óleos essenciais atuam na porção inferior do intestino delgado. Além disso, a combinação entre eles pode potencializar os seus efeitos no que se refere às ações antimicrobianas, ao aumentar a permeabilidade da membrana bacteriana, reduzindo a multiplicação de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Complementarmente, podem promover maior estímulo à secreção de enzimas digestivas e reduzir o desenvolvimento de fungos em rações (LANGHOUT, 2005).

Rostagno et al. (2004), relataram que uma das explicações para ausência de efeito benéfico dos aditivos alternativos em experimentos com frango de corte pode ser a falta de desafio, em decorrência do pouco uso e da boa higiene das instalações onde foram realizados os experimentos, que evidentemente não são parecidas com as condições sanitárias normalmente encontradas nos aviários comerciais. Portanto, ficou evidenciado que condições adequadas de práticas de manejo e sanitárias justificam a ausência de efeitos expressivos dos aditivos alternativos.

Visualizamos, nas análises das amostras dos animais com 41 dias de idade, que os tratamentos com PRO e EN + CPP foram os mais eficazes na redução da carga microbiana de *E. coli*, entretanto os efeitos destes não foram estatisticamente diferentes em relação ao CN, mas foram diferentes em relação ao EN. Trabalhos na literatura

demonstram que o espectro de ação da enramicina apresenta uma potente ação bactericida principalmente contra bactéria Gram positiva (Shering-Plough, 2011), o que pode explicar que nesse estudo o EN não apresentou eficácia contra *E. coli*, por ser uma bactéria Gram negativa.

De acordo com os resultados obtidos neste experimento em relação ao probiótico, Jin et al. (2000) e Cao et al. (2013) verificaram o efeito protetor contra a colonização por *Escherichia coli* em frango de corte que receberam próbiotico à base de *Bacillus subtilis* e de *E. Faecium* respectivamente. Levkut et al. (2009, 2012) relataram que o *E. faecium* reduziu a quantidade cecal de *Salmonella* em frangos desafiados. Da mesma forma, outros grupos demonstraram que os probióticos, incluindo *Lactobacillus acidophilus* e *E. faecium*, reduziram concentrações de *Campylobacter jejuni* em frangos (Morishita et al., 1997; Willis e Reid, 2008; Ghareeb et al., 2012). Também, Cao et al. (2013) demonstraram que dietas suplementadas com *E. faecium* aumentavam as concentrações de *Lactobacillus* cecal, com 14 e 21 dias de idade, e de bifidobactérias cecal, com 21 dias, em frangos de corte desafiados.

Provavelmente, como os resultados deste trabalho sugerem, o uso de probióticos possa aumentar a contagem de bactérias benéficas produtoras de ácido láctico e a diminuição da carga bacteriana por *E. coli*.

Houve uma diminuição da contagem de *Escherichia coli* em relação a evolução da idade de coleta para os tratamentos CN, PRO, CPP + PRO e o EN + CPP. Nos três primeiros tratamentos citados acima já foi observado um efeito significativo entre a coleta de 11 e 27 dias, sendo que o CPP na fase de coleta de 27 dias diferiu em relação a todos os outros tratamentos, inclusive em relação ao CN, isso pode sugerir que o uso desse produto até essa fase de 27 dias pode ser benéfico no controle da *E. coli*, já que

essa fase é um momento de maiores desafios entéricos em frango de corte. Já em relação ao tratamento EN associado ao CPP só apresentou diferença após a coleta final de 41 dias. Essa diminuição da contagem de *E. coli* com a evolução da idade pode ser explicado, de acordo com Friedman et al. (2003) e Montassier (2009), pelo fato de que aves jovens são imunologicamente imaturas e que com avançar da idade o sistema imune se torne mais competente. O aparecimento e desenvolvimento do sistema imune depende estritamente de estímulos antigênicos produzidos na mucosa intestinal, que ocorrerão após o nascimento, com a ingestão de alimentos e o estabelecimento da microbiota normal e dos microorganismos patogênicos.

CONCLUSÃO

O uso do CPP, na alimentação de frangos de corte, melhora o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte, enquanto o CPP e PRO reduzem a colonização bacteriana por *E. Coli* no trato intestinal destes.

REFERÊNCIAS

Alvarenga, B. O.; Beletti, M. E.; Fernandes, E. A.; Silva, M. M.; Campos, L. F. B.; Ramos, S. P. Efeitos de fontes alternativas de fósforo nas rações de engorda e abate sobre a morfologia intestinal de frangos de corte. **Bioscience Journal**, v.20, n.3, p.55–59, 2004.

Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S.; Bohm, J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v.88, n.1, p.49-56, 2009.

Bertechini, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora UFLA. 2006. 301p.

Boemo, L. S.; Rosa, A. P.; Aristimunha, P. C.; Scher, A.; Garcez, D.; Rosa, D. P.; Santos, C. B.; Manfio, V. M. Crina Poultry Plus as an alternative feed additive to antibiotic growth promoters in broiler diets. In: International Poultry Scientific Forum (SPSS), 2012, Atlanta, Ga - EUA. *Poultry Science Supplement*, 2012. p. 229-230.

Cao, G. T.; Zeng, X. F.; Chen, A. G.; Zhou, L.; Zhang, L.; Xiao, Y. P.; Yang, C. M. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. **Poultry science**, v.92, n.11, p.2949-2955, 2013.

Corrêa, G. S. S.; Gomes, A. V. C.; Corrêa, A. B.; Salles, A. S.; Mattos, E. S. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p.467-473, 2003.

Dale, N. Probióticos para aves. **Avicultura profissional**, v.10, p.88-89, 1992.

Flemming, J. S. Promotores de Crescimento Alternativos: Ácidos Orgânicos, Óleos Essenciais e Extratos de Ervas. 2010. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA.avicultura/nutricao/foruns/promotorescrescimentoalternativos-acidos-t394/141-p0.htm>. Acesso em: 03 fev. 2015.

Friedman, A.; Bar-Shira, E.; Sklan, D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **World Poultry Science Journal**, v.59, n.2, p.209–220, 2003.

Fukayama, E. H.; Bertechini, A. G.; Geraldo, A.; Kato, R. K.; Murgas, L. D. S. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2316-2326, 2005.

Ghareeb, K.; Awad, W. A.; Mohnl, M.; Porta, R.; Biarnes, M.; Bohm, J.; Schatzmayr, G. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **Poultry Science**, v.91, n.8, p.1825-1832, 2012.

Godoi, M. J. S.; Albino, L. F. T.; Rostagno, H. S.; Gomes, P. C.; Barreto, S. L. T.; Vargas Júnior, J. G. Utilização de aditivos em rações formuladas com milho normal e de baixa qualidade para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.1005-1011, 2008.

Griggs, J. P.; Jacob, J. P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, n.4, p.750–756, 2005.

Kamel, C. A novel look at a classic approach of plant extracts. Feed Mix - The International Journal on Feed, Nutrition and Technology –Special: Alternatives to antibiotics. **Doetinchen**, v.9, n.6, p.19-24. 2000.

Henrique, A. P.; Faria, D.; Franzolin, R.; Ito, D. T. Uso de probióticos e antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte. In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, p. 297-299. 1998.

Jin, L. Z.; Marquardt, R. R.; Zhao, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4200–4204, 2000.

Jones, F. T.; Ricke, S. C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry science. **Poultry Science**, v.82, n.4, p.613-612, 2003.

Kisielinski, K.; Willis, S.; Prescher, A.; Klosterhalfen, B.; Schumpelick, V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v.2, n.3, p131-135, 2002.

Langhout, P. Alternativa ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2005, Santos, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, v.1, p.21-33. 2005.

Lee, K. W.; Everts, H.; Kappert, H. J.; Wouterse, H.; Frehner, M.; Beynem, A. C. Essential oils in broiler nutrition. Int. **Journal Poultry Science**, v.3, n.12, p.738-752, 2004.

Levkut, M.; Pisl, J.; Lauková, A.; Revajová, V.; Herich, R.; Sevcíková, Z.; Strompfová, V.; Szabóová, R.; Kokincáková, T. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* 55 against *Salmonella Enteritidis* in chicks. **Acta Vet. Hung.**, v.57, n.1, p.13–24, 2009.

Levkut, M.; Revajová, V.; Lauková, A.; Sevcíková, Z.; Spisáková, V.; Faixová, Z.; Levkutová, M.; Strompfová, V.; Pisl, J. Leukocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challenged with *Salmonella Enteritidis*. **Res. Vet. Sci.**, v.93, n.1, p.195–201, 2012.

Lima, A. C. F.; Pizauro JR., J. M.; Macari, M.; Malheiros, E. B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

Loddi, M. M.; Tucci, F. M.; Hannas, M. I. Probióticos, mananoligossacarídeos + ácidos orgânicos em dietas de frangos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...**Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2002]. (CD-ROM).

Martins, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2000. 220p.

Medeiros, P. T.; Padilha, M. T. S.; Padilha, J. C. F.; Espindola, F.; Maggioni, R. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. **Revista Biotemas**, v.22, n.3, p.157-163, 2009.

Merck (2000). Diagnóstico rápido de *E.coli* com Meios de Cultura Flurocult. 2000.

Mith, H.; Clinquart, A.; Zhiri, A.; Daube, G.; Delcenserie, V. The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157: H7. **FEMS Microbiology Letters**, v.362, n.1, p.1-7, 2014.

Morishita, T. Y.; Aye, P. P.; Harr, B. S.; Cobb, C. W.; Clifford, J. R. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. **Avian Dis.**, v.41, n.4, p.850–855, 1997.

Montassier, H. J. Fisiopatologia do sistema imune . In: Berchieri Júnior, A.; Silva, E. N.; Di Fábio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. Doença das Aves. São Paulo: FACTA. 2009. p.391-422.

Pelicano, E. R. L.; Souza, P. A.; Souza, H. B. A.; Leonel, L. F. R.; Zeola, N. M. B. L.; Boiago, M. M. Productive traits of broiler chickens fed diets containing different growth promoters. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.6, n.3, p.177-182, 2004.

Pedroso, A. A.; Menten, J. F. M.; Longo, F. A. Desempenho de frangos de corte recebendo ração suplementada com aditivos microbianos e criados em baterias ou em galpão convencional. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 39.,2002,Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2002]. (CD-ROM).

Ribeiro, R. P.; Flemming, J. S.; Bacila, A. R. Uso de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), parede celular de leveduras (SSCW), ácidos orgânicos e avilamicina na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.3, p.210-217, 2008.

Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T.; Euclides, R. F. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Ed. 3. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.

Rostagno, H. S.; Dionízio, M. A.; Albino, L. F. T. Perspectivas da nutrição de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. 17p. (CD-ROM).

Santurio, J. M.; Santurio, D. F.; Possatti, P.; Moraes, C.; Franchin, P. R.; Alves, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

Schering-Plough, S. A. 2011. **ENRADIN*** F80. Disponível em <http://www.medicamentos.com.mx>.

Silva, C. R. **Uso de probiótico em rações de frangos de corte: Desempenho e digestibilidade da energia metabolizável**. Dissertação. UFV, Viçosa, 2008. 77p.

Wang, C. Y.; Wang, S. Y.; Yin, J.; Parry, J.; Yu, L. L. Enhancing antioxidant, antiproliferation and free radical scavenging activities in strawberries with essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, n.16, p.6527–6532, 2007.

Weber, G. M.; Michalczuk, M.; Huyghebaert, G.; Juin, H.; Kwakernaak, C.; Gracia, M. I. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on performance of broiler chickens as revealed by a meta-analysis of 4 growth trials in various locations. **Poultry Science**, v.91, n.11, p.2820–2828, 2012.

Willis, W. L.; Reid, L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. **Poultry Science**, v.87, n.4, p.606–611, 2008.