

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**EFEITOS DE PROBIÓTICO, ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMAS EM
PARÂMETROS PRODUTIVOS E SANITÁRIOS DE FRANGOS DE CORTE**

IONE IOLANDA DOS SANTOS
Engenheira Agrônoma (UFSC)
Mestre em Agroecossistemas (UFSC)

Tese apresentada como requisito à obtenção do Grau de Doutor em
Zootecnia
Área de Concentração em Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2010

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela saúde e inteligência, condição e atributo indispensáveis nesta jornada.

À Universidade Federal de Santa Catarina, principalmente aos professores do Departamento de Zootecnia, pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela chance, em especial ao professor ALEXANDRE DE MELLO KESSLER pela confiança, generosidade e orientação.

À professora Gertrudes Corção pela orientação e disponibilidade de seu laboratório.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia/UFRGS, pelo conhecimento compartilhado e a professora Matilde Achaval Elena pela disponibilização de seu laboratório para execução de parte de meus trabalhos experimentais.

Aos colegas do LEZO e do Laboratório 166 da Microbiologia, pela ajuda prestada na realização dos trabalhos experimentais e pela troca de conhecimentos.

À indústria DSM pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

À minha família e amigos pelo incentivo, em especial às minhas filhas, cuja alegria de viver foi meu combustível diário para seguir em frente.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!

EFEITO DE PROBIÓTICO, ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMAS EM PARÂMETROS PRODUTIVOS E SANITÁRIOS DE FRANGOS DE CORTE¹

Autora: Ione Iolanda dos Santos

Orientador: Prof. Alexandre de Mello Kessler

RESUMO

A busca de maior eficiência alimentar visando a maximização da produção avícola tem direcionado pesquisas em aditivos para rações que possam atuar no controle de agentes prejudiciais ao processo digestivo. Muitos desses benefícios foram observados em pesquisas com probióticos, óleos essenciais e enzimas nas últimas décadas. Em face a importância que os aditivos representam para a avicultura, dois experimentos foram desenvolvidos para avaliar o efeito do probiótico a base de *E. faecium*, da mistura dos óleos essenciais extraídos de tomilho e cravo-da-índia e da combinação das enzimas xilanase, β -glucanase e amilase em dietas para frangos de corte. No primeiro experimento foi avaliado o efeito do probiótico e da mistura dos óleos essenciais, em dietas para frangos infectados por *Eimeria máxima* e *E. acervulina*. Analisou-se o desempenho, o escore de lesão e a morfometria intestinal dos animais. No segundo experimento foi avaliado o efeito do probiótico e das enzimas, isolados e em combinação, em dietas com duas formulações, uma com nível padrão de energia e outra com nível baixo de energia, sendo esta última reduzida em 100 kcal/kg de energia metabolizável em relação à dieta padrão. Analisou-se o desempenho, a morfometria e o pH do trato gastrointestinal; a digestibilidade das dietas e a produção de dejetos e; identificou-se o perfil molecular da comunidade de bactérias presente no lúmen ileal, através da técnica de eletroforese em gel por gradiente desnaturante (DGGE). O probiótico e a mistura de óleos essenciais não promoveram benefícios de desempenho e integridade intestinal aos animais que sofreram estresse infeccioso. Nas dietas com dois níveis de energia, o probiótico também não se mostrou eficiente aos animais sob quaisquer parâmetros analisados. Este também não foi detectado por DGGE no trato ileal dos animais que o consumiram. Contudo, tanto nas dietas contendo probiótico, quanto naquelas contendo enzimas foram verificadas, através do DGGE, alterações na população microbiana do trato ileal dos animais. As enzimas também mostraram eficiência nas dietas de baixa energia. Essas diminuíram ($P < 0,05$) parâmetros de morfometria e pH do trato gastrointestinal, melhoraram ($P < 0,05$) a digestibilidade das dietas e diminuíram ($P < 0,05$) a produção de dejetos no ambiente de criação. Contudo, essa eficiência só foi verificada no período inicial de criação.

¹ Tese de doutorado em Zootecnia – Produção animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, porto Alegre, RS, (198p.). Agosto de 2010.

PROBIOTIC, ESSENTIAL OIL AND ENZYMES IN PRODUCTIVE AND SANITARY PARAMETERS OF BROILERS¹

Author: Ione Iolanda dos Santos

Adviser: Prof. Alexandre de Mello Kessler

ABSTRACT

The search for greater feed efficiency for maximization of poultry production has directed research of feed additives that may act to control harmful agents to the digestive process. Many of these benefits were observed in studies with probiotics, enzymes and essential oils in recent decades. Given the importance that the additives present in broilers, two experiments were conducted to evaluate the effect of probiotic-based *E. faecium*, a mixture of essential oils from thyme and clove and the combination of enzymes xylanase, amylase and β -glucanase in diets for broiler chickens. In the first experiment the effect of probiotic and essential oil in diets for broilers infected with *Eimeria maximum* and *E. acervulina* was evaluated. The experiment the performance, the lesion score by eimérias and intestinal morphology of animals were analyzed. In the second experiment the effect of probiotic and enzymes alone and in combination in diets with both formulations, with a standard level of energy and one with low energy, the latter being reduced by 100 kcal / kg metabolizable energy compared to the standard diet were evaluated. The performance, morphology and pH of the trato gastrointestinal as well as the diet digestibility and production of waste were analyzed. The alterations of the community of bacteria present in the ileal lumen Also identified through the technique of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The probiotic and the mix of essential oils did not lead to performance benefits, intestinal integrity of animals who suffered stress infectious. Probiotics in the diets with two energy levels werenot efficient to animals about any parameters examined. The probiotic was also not detected by DGGE in the ileal tract of animals that had consumed it. However, both in the diets containing probiotic and in those containing enzymes was verified changes in the microbial population in the ileal tract of the animals by DGGE. The enzymes were also efficient in the low energy diets. These decreased ($P < 0.05$) parameters of morphometry and pH of the gastrointestinal tract improved ($P < 0.05$) the digestibility of diets and decreased ($P < 0.05$) the production of waste in the authoring environment. However this efficiency was only observed in the initial period of birds production.

¹Doctoral thesis in Animal Science, faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, (198p.). August, 2010.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Microbiota do trato gastrointestinal de frangos de corte.....	5
2.2. Probiótico.....	7
2.3. Óleos essenciais.....	16
2.4. Enzima.....	23
5.OBJETIVO GERAL.....	33
CAPÍTULO II.....	34
INTEGRIDADE INTESTINAL E DESEMPENHO DE FRANGOS CORTE SOB ESTRESSE INFECCIOSO.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÃO.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	49
CAPÍTULO III.....	55
PROBIÓTICO E ENZIMAS EM DIETAS COM DOIS NÍVEIS DE ENERGIA: PARÂMETROS PRODUTIVOS E INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE.....	56
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
INTRODUÇÃO.....	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	73
CAPÍTULO IV.....	82
PROBIÓTICO E ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: EFEITOS NA METABOLIZABILIDADE DAS DIETAS E PRODUÇÃO DE RESÍDUOS.....	83
RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	84
INTRODUÇÃO.....	85
MATERIAL E MÉTODOS.....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
CONCLUSÃO.....	104

BIBLIOGRAFIA	105
CAPÍTULO V	112
MICROBIOTA ILEAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS À DIFERENTES DIETAS	113
RESUMO	113
ABSTRACT	114
INTRODUÇÃO	115
MATERIAL E MÉTODOS.....	117
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
CONCLUSÃO	126
BIBLIOGRAFIA	126
CAPÍTULO VI	131
1.CONCLUSÃO GERAL.....	132
2.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
3.BIBLIOGRAFIA.....	136
4.APÊNDICES	152
5.VITA	198

LISTA DE ABREVIATURAS

AV	Altura de vilos
BE	Energia baixa
CDMS	Coeficiente de digestibilidade da matéria seca
CDPB	Coeficiente de digestibilidade da proteína bruta
CMEB	Coeficiente de metabolizabilidade da energia bruta
CMMS	Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca
CMPB	Coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta
CR	Coeficiente de resíduo
CV	Comprimento de vilos
DGGE	Eletroforese em gel por gradiente desnaturante
dNTP	Nucleotídeotrifosfase
DV	Densidade de vilos
EA	Excreção de água
EMA	Energia metabolizável aparente
EN	Excreção de nitrogênio
EP	Energia padrão
FI	Fator de indigestibilidade
IA	Intestino anterior
LV	Largura de vilos
MN	Matéria natural
MS	Matéria seca
PD	Produção de dejetos
PC	Profundidade de cripta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNAs	Polissacarídeo não amiláceo solúvel
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidade formadora de colônia

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II	Página
1.Escore de lesão em frangos de corte sob estresse infeccioso por <i>Eimeria máxima</i> e <i>E. acervulina</i> aos 21 e 28 dias de idade.....	44
2.Parâmetros de morfometria (em μm) do íleo de frangos de corte sob estresse infeccioso por <i>Eimerias sp</i>	46
3.Desempenho zootécnico de frangos de corte nos períodos de 14 a 21 e de 22 a 28 dias de idade	49
CAPÍTULO III	
1.Composição e níveis nutricionais calculados para dietas experimentais nas fases inicial (1-21 dias) e de crescimento (22-35 dias).....	62
2.Desempenho zootécnico de frangos de corte nos períodos de 1 a 21 e de 22 a 35 dias de idade	66
3.Comprimento relativo (cm/kg de peso vivo) dos segmentos do TGI de frangos de corte aos 14 e 35 dias de idade.....	69
4.Peso relativo (g/kg de peso vivo) dos segmentos do TGI de frangos de corte aos 14 e 35 dias de idade.....	70
5.pH de segmentos do TGI de frangos de corte aos 14 e 35 dias de idade.....	72
CAPÍTULO IV	
1.Composição e níveis nutricionais calculados para dietas experimentais nas fases inicial (1-21 dias) e de crescimento (22-35 dias)	89
2.Coeficiente de metabolizabilidade total da matéria seca (CMMS), proteína bruta (CMPB), energia bruta (CMEB) e EMA em dietas de frangos de corte no período de 11 a 14 dias de idade.....	96
3.Método de coleta total e ileal para parâmetros de metabolizabilidade e digestibilidade das dietas de frangos de corte nos 32 a 35 dias de idade.....	97

4.Efeito de dietas de frangos de corte na produção de dejetos e excreção de água e nitrogênio (g/animal/dia) produzidos no período de 11 a 14 dias de idade.....	101
5.Efeito de dietas de frangos de corte na produção de dejetos e excreção de água e nitrogênio (g/animal/dia) produzido no período de 32 a 35 dias de idade.....	102
6.Efeito de dietas de frangos de corte no coeficiente de resíduo (g dejetos MS/g GP) nos períodos de 11 a 14 e 32 a 35 dias.....	104

CAPÍTULO V

1.Composição e níveis nutricionais calculados para dietas experimentais de frangos de corte.....	119
--	-----

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO IV	Página
1.Figura 1. DGGE do produto de PCR da região V3 do gene 16S do rRNA de amostras da digesta ileal de frangos de corte, alimentados com dietas contendo dois níveis de energia (Energia padrão-EP e Baixa energia-BE,) e diferentes aditivos: Controle (C), Probiótico (P), Enzima (E), Enzima + probiótico (E+P).....	125
2.Figura 2. Dendrograma dos amplicons obtidos pelo DGGE do PCR da região V3 do gene 16S do rRNA de amostras da digesta ileal de frangos de corte alimentados com dietas contendo dois níveis de energia (Energia padrão-EP, Baixa energia-BE) e diferentes aditivos: Controle (C), Probiótico (P), Enzima (E), Enzima +probiótico (E+P).....	126

CAPÍTULO I

1.INTRODUÇÃO

Um dos objetivos da avicultura é a busca constante de uma melhor eficiência alimentar. Muitos aditivos são rotineiramente adicionados em rações para controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo, visando promover melhoras nos índices zootécnicos e maximização da produção. Segundo o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2009), aditivos são substâncias ou mistura de substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos, com finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades desejáveis e suprimir as propriedades indesejáveis.

Nas últimas décadas a utilização de antibióticos e quimioterápicos (antimicrobianos) em doses profiláticas como aditivos às rações mostrou grandes benefícios na criação animal. Os antimicrobianos representam um grupo de compostos com estruturas químicas heterogêneas e propriedades físico-químicas diferentes, tendo como único ponto comum a capacidade antibacteriana (Jong et al., 1985). No trato gastrointestinal estão presentes algumas bactérias desfavoráveis ao hospedeiro que podem ser suprimidas pelos antimicrobianos, melhorando o desempenho do animal e estimulando o crescimento das bactérias benéficas. Contudo, a maioria dos antimicrobianos, na última década sofreu críticas relacionadas ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Acredita-se que o uso de antimicrobianos em doses profiláticas na produção animal provocaria uma menor eficiência das substâncias antibióticas à terapia para animais e humanos. Essa questão levou à proibição dos antimicrobianos profiláticos na maioria dos países produtores de aves. A exigência por parte dos importadores por produtos livres de resíduos de

antibióticos e quimioterápicos promoveu à busca de alternativas aos antimicrobianos.

Muitas pesquisas foram feitas com os aditivos digestivos e equilibradores da microbiota intestinal. Dentre os aditivos equilibradores da microbiota intestinal estão os probióticos e os óleos essenciais. Segundo Fuller (1989), o probiótico é um suplemento alimentar microbiano vivo, capaz de afetar benéficamente o hospedeiro, com capacidade de promover o equilíbrio da microbiota intestinal, prevenindo doenças no trato digestório. Além disso, melhora a digestibilidade das rações (Apata, 2008), levando à maior utilização dos nutrientes, o que resulta em melhor desempenho zootécnico dos animais (Kabir et al., 2004; Mountzouris et al., 2007; 2010). Mountzouris et al. (2007) demonstraram que o probiótico, além de melhorar o desempenho de frangos de corte, foi efetivo na regulação da microbiota cecal, sendo capaz de reduzir o nível de *Salmonella enteritidis*, quando os animais por ela foram desafiados (Mountzouris et al., 2009).

Segundo Burt, (2004), os óleos essenciais são substâncias extraídas das plantas ou parte delas (flores, sementes, raízes, folhas, brotos, ramos, caules-madeira e frutos), com propriedade antimicrobiana à patógenos (como *E. coli*, *S. enteritidis* e *C. perfringes*), regulando a microbiota digestiva e promovendo a saúde intestinal. Os óleos essenciais também são capazes de induzir a produção de enzimas endógenas e aumentar a digestibilidade dos alimentos. Segundo Chao et al. (2000), a ação antibacteriana de 45 óleos essenciais testados contra um largo espectro de micro-organismos, demonstrou uma maior resistência das bactérias gram negativas em relação as gram positivas. Resultado semelhante foi encontrado por Smith-Palmer et al. (1998)

sobre patógenos de alimentos (*E. coli*, *S. enteritidis*, *C. jejuni*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) quando utilizaram óleos essenciais a base de canela, tomilho e cravo-da-índia.

Dentre os aditivos digestivos encontram-se as enzimas. Segundo Choct et al. (1999), as enzimas exógenas são introduzidas à alimentação animal para aumentar a digestibilidade e a eficiência de utilização dos alimentos, reduzindo a ação de inibidores de crescimento, sobretudo dos polissacarídeos não amiláceos solúveis, encontrados como componentes estruturais das paredes celulares dos cereais. Zanella et al. (1999), observaram melhoria no ganho de peso e na conversão alimentar, em dietas a base de milho/farelo de soja, quando as enzimas xilanase, amilase e protease foram adicionadas à ração e, Steinfeldt et al. (1998b) e Garcia et al. (2008) constataram uma melhora na conversão alimentar e diminuição da viscosidade intestinal em dietas com trigo/farelo de soja pela introdução das enzimas xilanase e β -glucanase.

Diante da importância dos aditivos zootécnicos, brevemente descritos nesta introdução, o trabalho de tese apresentado nos capítulos que se seguem abordará o efeito do probiótico, dos óleos essenciais e das enzimas digestivas sobre parâmetros produtivos e sanitários. No capítulo I serão apresentados as hipóteses, os objetivos, bem como uma revisão sobre cada aditivo avaliado; no capítulo II, o probiótico e uma mistura de óleos essenciais serão avaliados em dietas para frangos submetidos ao estresse infeccioso por *Eimerias sp*; nos capítulos III, IV e V, será demonstrado o efeito do probiótico e das enzimas em dietas com dois níveis de energia e; para finalizar no capítulo VI será apresentado uma conclusão geral, com breves considerações a respeito

dos resultados obtidos com a utilização dos aditivos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microbiota do trato gastrointestinal de frangos de corte

O trato gastrointestinal (TGI) das aves é composto predominantemente por bactérias, formando um sistema complexo e dinâmico. Aquelas que colonizam o TGI do animal desde o nascimento, tendem a permanecer ao longo da vida, passando a compor a microbiota do TGI da ave. A formação desta microbiota se dá principalmente logo após o nascimento e aumenta durante as primeiras semanas de vida, até se tornar a população predominante do TGI. Os principais gêneros de bactérias identificados são *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus* e *Streptococcus*.

No entanto, Apajalahti et al. (2004) utilizando técnicas de DNA microbiano observaram que 90% das bactérias encontradas no TGI das aves são desconhecidas, demonstrando que o número de bactérias pode alcançar 10^9 e 10^{11} UFC/g de conteúdo ileal e cecal, respectivamente, durante os 3 primeiros dias pós-eclosão, permanecendo-se estável nos próximos 30 dias.

O número e a composição dos micro-organismos do TGI das aves variam consideravelmente. No englúvio existe a predominância de *Lactobacillus*, que produzindo ácido láctico e acético mantém o pH reduzido, impedindo o crescimento de outras bactérias. O pH no proventrículo e moela são extremamente baixos e poucas bactérias são capazes de tolerar este ambiente, predominando os *Lactobacillus*, *Streptococcus* e coliformes. No

duodeno, jejuno, íleo e cecos o pH está mais próximo da neutralidade e outros micro-organismos colonizam estes segmentos.

As espécies que compõe a microbiota do TGI podem ser de origem patogênica e benéfica e desempenham funções específicas. A população patogênica é responsável por infecção, putrefação intestinal, produção de toxinas e redução da digestão e absorção de nutrientes. A população benéfica atua na produção de vitaminas, estimulação do sistema imune, inibição de bactérias patogênicas, redução da produção de gases e melhora da digestão e absorção de nutrientes (Jeurissen et al., 2002).

As bactérias que habitam o TGI podem estabelecer-se de duas formas: em profunda associação com epitélio ou livres na luz intestinal (fixadas ou não ao substrato da dieta), mas se multiplicando mais rapidamente do que sua eliminação pelo peristaltismo intestinal (Jeurissen et al., 2002). Algumas espécies bacterianas não apresentam capacidade de aderir-se ao epitélio intestinal, tampouco se multiplicam em tempo que compense a eliminação pelo peristaltismo, mas permanecem no intestino se agregando a outras bactérias, que por sua vez estão aderidas à mucosa entérica (Gusils et al., 1999).

Os indivíduos de uma comunidade de bactéria não vivem independentes entre si, mas necessitam da interação que estabelecem com as demais bactérias e com o próprio ambiente do TGI. As comunidades de bactérias são energeticamente mais eficiente e metabolicamente mais flexíveis do que as espécies vistas individualmente. Se uma espécie de bactéria não desempenha um único papel para a sobrevivência da comunidade, essa é eliminada por pressão de seleção. Assim como, qualquer espécie menos adaptada é eliminada se aparecer outra mais eficiente (Apajalahti, 2005).

A abundância das bactérias presentes na microbiota do TGI também é regulada por fatores ambientais, substratos da dieta (enzimas e ácidos graxos voláteis, por exemplo) e substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, entre outros) (Apajalahti & Kettunen, 2002). Através da dieta é possível afetar o desenvolvimento do TGI e a competição dos micro-organismos benéficos, podendo alterar não somente a dinâmica, mas também muitos processos fisiológicos devido ao produto final metabolizado pela microbiota (Shakouri et al. 2009). Aditivos tais como probióticos, óleos essenciais e enzimas também têm esse papel. Esses aditivos são utilizados na dieta de aves, com o objetivo de favorecer as relações entre as bactérias benéficas do TGI, beneficiando a saúde e o desempenho do animal (Demir et al., 2003; Huang et al., 2004; Oviedo-Rondón et al., 2006; Zhou et al., 2009; Mountzouris et al., 2010).

2.2. Probiótico

2.2.1. Definição

A história desse aditivo é conhecida há centenas de anos, mas somente no início do século XX foi estudada racionalmente e pesquisada com bases científicas. O uso de organismos probióticos surgiu no Oriente Médio, onde os médicos prescreviam iogurtes e outros leites fermentados como terapia para afecções gastrointestinais e também como estimulante do apetite. A primeira informação sobre leites fermentados, influenciando a saúde humana, foi publicada por Metchnikoff (1907), pesquisador do Instituto Pasteur de Paris, após observar a longevidade de camponeses búlgaros e atribuir o fato à dieta constituída basicamente de leite fermentado. Pesquisando os componentes do leite, Metchnikoff isolou o *Bacillus bulgaricus*, identificando-o depois como *Lactobacillus bulgaricus*. No seu livro “The prolongation of life”, o pesquisador

especulou que micro-organismos nocivos ao aparelho intestinal expõem substâncias prejudiciais ao hospedeiro. Então, por ingestão de alimentos benéficos, no caso o leite fermentado, pode-se melhorar o ambiente intestinal, fortalecendo a saúde e aumentando a expectativa de vida do indivíduo.

Lilly & Stillwel (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, verificando a ação de micro-organismos como reguladores da microbiota intestinal. Contudo, o marco do uso de probióticos em aves foi dado por pesquisadores finlandeses (Nurni & Rantala, 1973) administrando probiótico oralmente às aves de um dia de idade. Eles observaram que o probiótico alterou a sensibilidade das aves adultas à infecção causada por *Salmonella spp*, prevenindo o estabelecimento desta no intestino. Esta idéia foi conceituada como “Exclusão Competitiva”.

2.2.2. Composição e formas de administração

Os probióticos podem conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas. Há probióticos com diferentes composições de micro-organismos e mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie, podem conter cepas diferentes (Griggs & Jacob, 2005).

As espécies animais para as quais existem produtos comerciais disponíveis são aves, suínos, bovinos, ovinos, equinos, cães e gatos. As espécies de bactérias mais comuns utilizadas no preparo dos probióticos são: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. johonsii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium spp*, *Bacillus subtilis* e *B. toyoi*. É importante que as bactérias sejam hospedeiro-específicas para que a máxima eficácia do probiótico seja atingida (Butolo, 2001).

A dose resposta pode variar, mas resultados encontrados na literatura preconizam uma concentração de 10^8 a 10^{10} UFC/kg de ração (Patterson & Burkholder, 2003; Apata, 2008; Mountzouris et al., 2010). Os probióticos podem ser aplicados de várias formas: adicionados nas rações (Dos Santos et al, 2004; Mountzouris et al., 2007; 2009; 2010), na água de beber (Timmerman et al., 2006), em cápsulas gelatinosas (Doleyres & Lacroix 2005), inoculados em ovos de aves embrionados e na cama usada de aves (Schneitz, 1992; Andreatti Filho et al., 1997). Podem ser usados por períodos curtos ou continuamente, de acordo com a finalidade (Dale,1992). Tem-se relatado que a administração precoce de probióticos para neonatos diminuiu os índices de mortalidade e para jovens melhoraram o desempenho (Fox, 1988; Huang et al., 2004). De acordo com Menard et al, (2004), em caso de diminuição das defesas orgânicas, o uso do probiótico pode ser vantajoso pela normalização da população microbiana intestinal e pelo aumento da resistência das aves ao estresse.

2.2.3. Critérios de seleção para a efetividade do probiótico

Vários pontos devem ser considerados na seleção e produção de micro-organismos probióticos (Simon & Gorbach, 1984; Jones & Tomas, 1987; Vanbelle et al., 1990; Holzapfel & Schillinger, 2002; Smirnov, et al., 2005):

Devem ser habitantes naturais do TGI de animais saudáveis e espécie-específica. As estirpes adequadas para aves, por exemplo, podem não ter a mesma eficiência em outras espécies;

Devem ser capazes de produzir culturas viáveis em concentrações efetivas. Embora as medidas de concentração não sejam ainda precisamente

estabelecidas, estima-se que deva ser por volta de 10^8 a 10^{10} UFC/kg de ração;

Os micro-organismos devem ser cultivados num ambiente muito semelhante ao que será introduzido, do contrário seu tempo de crescimento pode ser prolongado e eles podem não conseguir se multiplicar e colonizar o TGI;

Devem possuir bactérias capazes de serem ativadas e multiplicadas rapidamente, após a ingestão do produto, com o intuito de inibir patógenos e proporcionar condições de resistência ao peristaltismo;

As estirpes selecionadas devem ser tolerantes às enzimas salivares, ácidos gástricos, sais biliares e ácidos orgânicos voláteis;

Não podem ser patogênicos ou capazes de produzir efeitos adversos no hospedeiro e devem ser capazes de se aderir às células epiteliais do intestino e excretar bacteriocinas e;

Devem ser estáveis e precisam manter a viabilidade por longos períodos quando estocados e devem resistir aos antimicrobianos e as altas temperaturas do processamento.

2.2.4. Mecanismo de ação

Existem alguns modos de ação propostos para os probióticos na sua atividade contra micro-organismos patogênicos, aumentando a resistência do hospedeiro às desordens (doença e estresse). São mecanismos de ação:

2.2.4.1. Competição por sítios de adesão ou ligação

Este conceito também ficou conhecido como exclusão competitiva (Nurmi & Rentala, 1973). Presume-se que as bactérias probióticas ocupam sítios de ligação (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas, reduzindo ou impedindo

sua adesão (Junqueira & Duarte, 2008).

Certas espécies de bactérias produtoras de ácido láctico competem com coliformes por sítios de aderência intestinais (Sissons, 1989; Cross, 2002). Estudo conduzido com espécies de *Bifidobacterium* verificou que, a propriedade de competir pelos sítios de adesão é dependente do número de bactérias viáveis que chegam ao local a ser colonizado e do tipo de receptor específico para a bactéria (Vanbelle, 1990). Além disso, acredita-se na existência de interrelações entre alguns dos metabólitos produzidos pelas espécies probióticas. Algumas espécies de *Bifidobacterium*, por exemplo, têm afinidade de ligação pelos receptores β -glucosamina que são os mesmos sítios de ligação de algumas espécies de *E. coli* enteropatogênicas (Jin et al., 1997).

2.2.4.2. Atividade antimicrobiana

A produção de ácido láctico e acético pelas bactérias utilizadas como probióticos reduz o pH do ambiente do TGI, prevenindo o crescimento de vários patógenos, inclusive coliformes e permite o desenvolvimento de certas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus* (Klaenhammer, 1982; Bjerrum et al., 2005). Outras substâncias microbianas como bacteriocinas, nisina, acidofilina, lactalina, peróxido de hidrogênio e toxinas letais para certos patógenos, também são produzidas por micro-organismos de ação probiótica (Vanbelle et al., 1990; Servin, 2004). Estas substâncias apresentam atividade inibitória tanto para bactérias gram-negativas quanto para gram-positivas, como a *Salmonella* spp., *E. coli* e *Staphylococcus* spp. As bactérias intestinais, utilizando-se de ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro, produzem alguns ácidos orgânicos, como o propiônico, o acético, o butírico e o láctico cujo espectro de ação inclui também a inibição do crescimento de

bactérias patogênicas (Rebolé et al., 2010). Aparentemente, a ação bacteriostática dos ácidos graxos é dependente do pH, pois quanto maior a redução deste, mais intenso será seu efeito antibacteriano (Bjerrum et al., 2005). Não deve ser descartada a ideia de que todas estas substâncias antibacterianas podem atuar em associação, não só entre si como fatores desencadeantes e processantes, mas também como bloqueio físico. Algumas bactérias secretam enzimas como a β -glucoronidase e hidrolases de sais biliares que liberam compostos como ácidos biliares com ação inibitória sobre as outras bactérias (Jin et al., 1997).

2.2.4.3. Neutralização de enterotoxinas e atividade metabólica

Certos micro-organismos produzem metabólitos que são capazes de neutralizar os efeitos de enterotoxinas produzidas por coliformes (Sissons, 1989) e ainda reduzem a absorção de substâncias tóxicas como, por exemplo, amônia (Vanbelle et al., 1990). Alguns probióticos que contém *Bifidobacterium* previnem a formação de aminas tóxicas pelas bactérias intestinais (Stewart & Chesson, 1993) e atuam sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (Kozasa, 1986) e, liberando enzimas (De Vrese et al., 2001) que auxiliam na digestão dos alimentos.

2.2.4.4. Aumento da imunidade

As bactérias probióticas têm capacidade de resposta imune sistêmica aumentando o número e a atividade de células fagocíticas do hospedeiro (Sissons, 1989). As aves possuem acúmulos de tecidos linfáticos espalhados ao longo do trato intestinal que são as placas de Peyer, Tonsilas cecais e a Bolsa de Fabrícus. Esses tecidos captam antígenos disponibilizados no trato digestório, que estimulam as células B precursoras de IgA e, células T

colaboradoras das placas de Peyer, para desenvolvimento de uma imunidade geral e inespecífica (Bar-Shira et al., 2003; Erf, 2004). Koenen et al. (2004) verificaram um aumento da produção de anticorpos tipo IgA, pelo estímulo imunológico da mucosa. Segundo esses autores, os anticorpos bloquearam os receptores da mucosa e reduziram o número de bactérias patogênicas na luz intestinal. Dalloul et al. (2003) relatam um aumento na produção de linfócitos intraepiteliais no intestino e na expressão de linfócitos CD3, CD4 e CD8, demonstrando que o estímulo da imunidade da mucosa intestinal pelo probiótico, previamente a uma infecção por *Eimeria acervulina*, podia proteger contra coccidiose. Koenen et al. (2004), constataram o aumento nos títulos de IgA, IgG e IgM em frangos que receberam *Lactobacillus plantarum* e *L. paracasei* isolados e em combinação e Kabir et al. (2004) encontraram um aumento significativo de anticorpos nas aves alimentadas com probióticos, refletindo num desempenho significativamente maior em relação aqueles que receberam a dieta controle.

2.2.4.5. Efeito trófico

Relatos de Cook & Bird (1973) indicaram que aves criadas em ambientes livres de patógenos apresentaram uma redução na altura de vilos, bem como na profundidade de cripta, sugerindo que o crescimento normal do epitélio intestinal dependa também do equilíbrio da população de micro-organismos ali residentes. Assim, a integridade da mucosa do trato gastrointestinal confere aos frangos de corte condições adequadas para a digestão e absorção dos nutrientes.

Nos últimos anos, o emprego de micro-organismos intestinais têm proporcionado bons resultados na nutrição das aves, principalmente em

condições experimentais. Alguns probióticos têm demonstrado efeito trófico no TGI animal, favorecendo os processos mitóticos na região crípta-vilos, aumentando o número e o tamanho de vilos e possibilitando maior área de absorção de nutrientes (Junqueira et al., 2009). Segundo Awad et al. (2009), a adição do probiótico *Enterococcus faecium* DSM 3530 nas dietas de frangos de corte teve um efeito significativamente melhor sobre o desempenho, o peso dos órgãos e a histomorfometria intestinal em relação aos animais que receberam dieta controle. Pelicano et al. (2003) observaram um aumento significativo na altura (duodeno) e perímetro de vilo (duodeno e jejuno) em aves alimentadas com probióticos, conferindo maior área de absorção de nutrientes (Macari, 1999).

2.2.5. Probiótico a base de *Enterococcus faecium*

O gênero *Enterococcus* caracteriza-se por ser constituído de micro-organismos colonizadores transitórios do trato gastrintestinal, indispensáveis no tratamento das diarreias, principalmente na invasão do *Clostridium* (Ecology Health Center, 2005).

Entretanto, o *E. faecium* foi, por muito tempo, confundido com o *E. fecalis*, uma espécie patogênica, razão pela qual seus estudos foram prejudicados, tendo seu início tardio em relação as demais bactérias benéficas ao organismo animal e humano (Ecology Health Center, 2005).

O *E. faecium* é uma bactéria não patogênica, com um tempo de reprodução de 19 minutos, diferente do *Lactobacillus* e do *Bifidobacterium* que é de aproximadamente 60 minutos. Com reprodução três vezes mais rápida, seu efeito na remoção de bactérias patogênicas no intestino pode ser mais efetivo. É resistente ao ácido gástrico, sendo pouco inibido quando veiculado

por suplemento oral (Ecology Health Center, 2005).

Na literatura pode-se encontrar trabalhos acerca de sua capacidade competitiva ou antagônica a micro-organismos patogênicos (Audisio et al., 2000; Shin et al., 2008). Segundo Shin et al. (2008) foi possível constatar um efeito inibidor dos *Enterococcus faecium* SH 528, *E. faecium* SH 632 e *Pediococcus pentosaceus*, isolados do TGI de frangos de corte, contra *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes*.

Essas habilidades ou características dos *Enterococcus sp* estão presentes em pesquisas com probióticos. Porém, a maioria dos probióticos *Enterococcus* se apresenta em combinação com outros micro-organismos. Mountzouris et al. (2007) avaliando a eficácia de um probiótico contendo cepas de *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Pediococcus* em dietas para frangos de corte constataram um desempenho (consumo de ração e ganho de peso) semelhante aos animais que receberam dietas com antibiótico. Além disso, esse probiótico apresentou um efeito regulador da microbiota, favorecendo o desenvolvimento e a proliferação de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* e estimulou a produção das enzimas α -galactosidase e β -galactosidase pela comunidade microbiana cecal.

Henrique et al. (1998) também não encontraram diferenças significativas ao comparar dois tipos de probióticos, um a base de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidiphylus* e *Sacharomyces cerevisiae* e outro constituído por *Bacillus subtilis*, com dois tipos de antibióticos, virginiamicina e avilamicina. Porém, constataram uma redução significativa na mortalidade (48,5%) para as aves que foram alimentadas com probióticos.

O efeito semelhante dos probióticos em relação aos antibióticos para

desempenho é bem visto na produção avícola, uma vez que o primeiro poderia, caso necessário, substituir o segundo sem afetar o desempenho. Contudo, trabalhos mostrando piora nos resultados de desempenho com o uso de probiótico a base de *Enterococcus faecium* foram encontrados na literatura. Gonzales (1998) e Loddi et al. (2000) comparando a inclusão de *Enterococcus faecium* com antibiótico avoparcina em dietas para aves, constataram que as aves alimentadas com probiótico apresentaram piora significativa de desempenho em relação ao antibiótico.

Contudo, a resposta contraditória encontrada na literatura científica a respeito da eficácia do probiótico *Enterococcus faecium*, também se aplica aos demais probióticos constituídos por outros micro-organismos e está associada às interações existentes no TGI do animal (Remhan et al., 2007) e também a multifatores, tais como, a viabilidade da cepa microbiana, o nível e a forma de administração, frequência de aplicação, tipo de dieta, idade da ave, condições de higiene do sistema de produção e fatores estressantes (Mountzouris et al., 2010).

2.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias extraídas das plantas ou parte delas (flores, sementes, raízes, folhas, brotos, caules e frutos) por destilação desde o século XIII D.C., mas teve seu uso disseminado apenas no século XIV D.C. em Londres (Burt, 2004). Contudo, a partir de 1881, com os estudos de De La Croix sobre suas propriedades antimicrobianas e efeitos flavorizantes é que foi amplamente disseminado (Burt, 2004). Em 1945, com o desenvolvimento da química farmacêutica sintética e emergência dos antibióticos produzidos pela fermentação de bactérias, houve uma diminuição do mercado e da pesquisa de

plantas medicinais (Scheuermann & Cunha Junior, 2006) e o uso de óleos essenciais como substâncias antimicrobianas quase desapareceu (Cowan, 1999). Nos anos 90, devido às restrições aos antimicrobianos melhoradores de crescimento na produção animal e o crescente apelo por consumo de produtos naturais, os óleos essenciais re-emergiram como alternativa de uso aos antibióticos e quimioterápicos melhoradores de crescimento.

2.3.1. Composição

A análise detalhada da composição dos óleos essenciais é obtida através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (Jerkovic et al., 2001; Delaquis et al., 2002). Os óleos essenciais do ponto de vista químico são constituídos pela mistura de vários componentes com alta complexidade, o que dificulta explicitar suas propriedades (Senatore, 1996; Russo et al., 1998). São geralmente misturas de terpenóides (linalol, geraniol, mentol, citronilol, α -terpinol, borneol, tuianol e citronilol) e uma variedade de hidrocarbonetos (fenóis como o timol, carvacrol, eugenol, gaiacol) e aldeídos aromáticos (como o cinomaldeído, cuminal e felandrol) (Dorman & Deans, 2000). A maioria dos componentes é caracterizada por dois ou três componentes em concentrações bastante altas (85%) comparado com outros em quantidade traço (Senatore, 1996; Bauer et al., 2001). Geralmente, os principais componentes refletem as características físicas e biológicas dos óleos essenciais. Os componentes fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais (Cosentino et al., 1999).

Alguns estudos mostram que a atividade dos principais componentes é regulada por outras moléculas (Gill et al., 2002; Morey & Canillac, 2002).

Dependendo da concentração dessas moléculas traço, os óleos essenciais podem ter suas propriedades antimicrobianas reduzidas ou potencializadas. É o caso dos óleos essenciais extraídos da artemísia (Marino et al., 2001); tomilho (Paster et al., 1995; Marino et al., 1999) e orégano (Paster et al., 1995).

A composição dos óleos essenciais também é afetada por fatores ligados a sua origem, como fatores ambientais (localização geográfica, clima, solo, chuvas, estação do ano e período de colheita) e genéticos (cultivares, parte da planta, assim como a fase de seu desenvolvimento) (Cosentino et al., 1999; Marino et al., 1999; Faleiro et al., 2002). Assim um óleo essencial extraído de plantas diferentes, mas de uma mesma espécie pode apresentar diferentes graus de suas propriedades antimicrobianas (Dorman & Deans, 2000). Segundo Marino et al. (1999), óleos essenciais produzidos durante ou imediatamente após a floração, geralmente apresentam maior atividade antimicrobiana. Delaquis et al. (2002) também constataram que o óleo essencial extraído da semente de coentro tem diferente composição comparado ao óleo extraído das folhas jovens da mesma planta.

2.3.2. Modo de ação dos óleos essenciais na nutrição de frangos

2.3.2.1. Sensibilidade oronasal e condicionamento digestivo

Os efeitos benéficos estimulantes de plantas condimentares na alimentação datam de muitos anos e tem sido recentemente pesquisada em experimento com animais. Os óleos essenciais a partir de alho, orégano, pimenta, canela, cominho, coentro, cebola entre outros, e seus compostos atuam como condimento através da ativação de três mecanismos de sensores periféricos nas cavidades oral e nasal (ou cavidade oronasal): sentido somatisador, cheiro e gosto (Tominaga & Julius, 2000; Platel & Srinivasan,

2004; Srinivasan, 2007). A sensibilidade oronasal prepara o trato gastrointestinal para a recepção do alimento e estimula as secreções e a mobilidade intestinal (Katschinski, 2000; Hiraoka et al., 2003; Laugerette et al., 2005). O animal percebe através dos receptores presentes na mucosa oronasal, o cheiro e o gosto condimentar do alimento e envia a informação para o nervo trigeminal no cérebro que dá o sinal de alerta para o aumento da motilidade gastrointestinal, a produção de saliva e consequente produção de enzimas e secreções gástricas e biliares (Kaunitz & Akiba, 2001; Akiba et al., 2002; Platel & Srinivasan, 2004) para proteger o epitélio digestivo. Contudo, como as aves ao contrário dos mamíferos, apresentam baixa percepção a gostos e cheiros condimentares, sua tolerância para óleos essenciais no alimento é bastante alta. Segundo Mason et al. (1991) e Roura et al. (2008), aves alimentadas com 20000 ppm de capsaicina e outros óleos essenciais se mostraram indiferentes a sua presença no alimento.

2.3.2.2. Atividade antimicrobiana e reguladora da microbiota do TGI

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi verificada em muitos trabalhos sobre bactérias, fungos, protozoários e vírus (Larrondo et al., 1995; Tabak et al., 1999; Dorman & Deans, 2000). Segundo Chao et al. (2000) a ação antibacteriana de 45 óleos essenciais testados contra um largo espectro de micro-organismos, demonstrou uma maior resistência das bactérias gram negativas em relação as gram positivas. Resultado semelhante foi encontrado por Smith-Palmer et al. (1998) sobre patógenos de alimentos (*E. coli*, *S. enteritidis*, *C. jejuni*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) quando utilizaram óleos essenciais a base de canela, tomilho e cravo-da-índia. A composição química

dos óleos essenciais pode variar de acordo com a localização geográfica e período de colheita das plantas. Esta possível variação na composição é suficiente para causar graus de suscetibilidade das bactérias gram positivas e negativas. Além disso, existe o efeito sinérgico ou antagônico entre os componentes principais (em maior nível) e os de menor representatividade presentes nos óleos essenciais, que pode potencializar ou reduzir a ação antimicrobiana. O sinergismo entre o carvacrol e seu precursor *p*-cineme sobre células vegetativas de *Bacillus cereus* foi demonstrado por Ultee et al. (2002). O *p*-cineme tem um efeito antimicrobiano, capaz de aumentar a permeabilidade das membranas das células bacterianas, favorecendo o transporte do carvacrol para o interior das células.

A mistura de cinamaldeído e eugenol (250 e 500 µg/mL, respectivamente), inibiram o crescimento de *Staphiloccocus* sp., *Bcacillus* sp., *Microccocus* sp. e *Enterobacter* sp. por mais de 30 dias, enquanto esses compostos aplicados individualmente não demonstraram esse mesmo efeito (Moleyar & Narasimham, 1992).

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais na nutrição de frangos previne doenças causadas por micro-organismos patogênicos, regula a microbiota do TGI e proporciona melhor desempenho do animal. O efeito de dois diferentes óleos essenciais não identificados (*blends*) foi constatado contra *Clostridium perfringens* no intestino e excreta de frangos por Mitsch et al. (2004). Segundo os autores, esse efeito foi obtido pela ação direta dos óleos essenciais sobre as bactérias. Contudo, as enzimas digestivas induzidas pelos óleos essenciais da dieta podem também aumentar a digestibilidade dos nutrientes e, regular e estabilizar a microbiota digestiva. A inativação de toxinas

de *C. perfringens* por enzimas digestivas, como a tripsina (Arbuckle, 1972; Baba et al., 1992) pode explicar como a colonização desta bactéria foi reduzida com o uso de óleos essenciais. Resultados semelhantes foram apresentados por Sims et al. (2004), demonstrando que frangos desafiados por *C. perfringens* apresentaram menos lesões intestinais e melhor desempenho, em relação a dieta controle, quando receberam dieta com mistura comercial de óleos essenciais ou bacitracina. Cross et al. (2002) e Jang et al. (2007) constataram a redução na contagem de coliformes em aves suplementadas com óleo de tomilho e com uma mistura comercial de óleos essenciais, incluindo o óleo de tomilho. Resultados semelhantes também foram encontrados com a mistura formada por capsaicina, cinamoaldeído e carvacrol, diminuindo o número de *E. coli* e *C. perfringens* (Tucker, 2002; Jamroz et al., 2003). Tellez et al. (1993) e Orndorff et al. (2005) em frangos e Vicente et al. (2007) em poedeiras também demonstraram efeito profilático da capseacina sobre *Salmonella enteritides*.

O efeito dos óleos essenciais tem sido demonstrado no controle de coccidiose em frangos de corte. O efeito de diferentes tratamentos no desempenho de frangos infectados com espécies de eimérias foi investigado por vários pesquisadores. Ibrir et al. (2002) com tomilho, Giannenas et al. (2003) com orégano e Christaki et al. (2004) com uma preparação comercial, não encontraram efeito entre os tratamentos para a excreção de oocistos durante o período de infecção, mas encontraram um benefício significativo no desempenho e diminuição na excreção de oocistos nas fezes no período pós infecção. Evans et al. (2001) constataram a redução da excreção de oocistos em frangos que receberam dietas contendo 50 ppm da mistura de óleos essenciais (cravo-da-índia 1%, tomilho 0,1%, hortelã-pimenta 0,1% e limão

0,1%) comparado com aqueles alimentados com dietas controle (não suplementadas). Assim como, Oviedo-Rondón et al. (2006) e Hume et al. (2006) que demonstraram o efeito de uma mistura comercial de óleos essenciais na regulação da população de micro-organismos intestinais de frangos vacinados contra coccidiose, evitando drásticas alterações após a infecção por coccídios.

Outros estudos sobre o efeito de óleos essenciais nas dietas para frangos de corte foram obtidos para respostas morfológicas e histológicas do trato intestinal. Jamroz et al. (2006) constataram um aumento no muco das paredes do jejuno em frangos alimentados com mistura comercial de óleos essenciais. A produção de muco pode afetar a adesão das bactérias na mucosa intestinal e promover mudanças na microbiota intestinal e evitar a proliferação de patógenos (Jeurissen, et al., 2002).

2.3.3. Óleos essenciais em parâmetros de produção de frangos

Vários trabalhos foram publicados ao longo das últimas décadas sobre o efeito de óleos essenciais no desempenho produtivo, atividades de enzimas digestivas e digestibilidade de dietas de frangos de corte. Um resumo sobre o efeito dos óleos essenciais no desempenho foi concentrado na revisão de Windisch et al. (2008). Pode-se observar em grande parte dos trabalhos uma redução no consumo de alimento e uma melhora na conversão alimentar. Diferindo desses resultados, outros autores (Lee et al., 2003; Hernández et al., 2004, Jang et al., 2007), usando óleo essencial de orégano, tomilho, pimenta, alho e mistura de óleos essenciais com tomilho não encontraram diferenças nos parâmetros de desempenho. Contudo, diferentes pesquisas desenvolvidas em muitos países ilustram o efeito positivo dos óleos essenciais no

desempenho de frangos. Assim como Kamel (1999; 2000) usando compostos a base de capsaicina e polifenóis, Jamroz et al. (2003) a base de capsaicina, cinamaldeído e carvacrol, Lewis et al. (2003) usando óleo essencial a base de alho e Alcicek et al. (2003; 2004) usando uma mistura de óleos essenciais a partir de extratos de alho e tomilho. Também foi encontrado um efeito de melhora no desempenho associado à redução do peso intestinal (Demir et al., 2003), com redução na profundidade de cripta no íleo quando óleos essenciais a base de alho e tomilho foram incluídos na dieta. Em um estudo com mistura de óleos essenciais a partir de orégano, canela, tomilho e pimenta (Zhang et al., 2005) em substituição ao antibiótico melhorador de desempenho (BMD e virginiamicina), foi encontrado valores de conversão alimentar foram semelhantes em ambas as dietas. Garcia et al.(2007) também encontraram resultados semelhantes entre antibiótico avilamicina e o óleo essencial a partir de sálvia, tomilho e orégano (capsaicina, cinamaldeído e carvacrol) para parâmetros de digestibilidade da dieta.

2.4. Enzima

2.4.1. Caracterização das enzimas

As enzimas são proteínas globulares, que atuam como catalizadores biológicos, sobre substratos específicos, dependente das condições ótimas de temperatura e pH, e aceleram a velocidade das reações químicas no organismo sem serem alteradas nesse processo. As enzimas se classificam com base nas reações que desempenham. Algumas enzimas são proteínas simples, outras conjugadas, e contém grupos prostéticos constituídos por íons metálicos, por coenzimas ou por ambos (Lehninger et al., 1995).

Além da atividade catalítica, as enzimas podem ser caracterizadas

por propriedades físicas e químicas como solubilidade, mobilidade eletroforética, número de cadeias polipeptídicas, coeficiente de sedimentação, massa molecular, composição de aminoácidos, sequência peptídica, estrutura secundária, terciária e eventualmente quaternária.

A estrutura molecular das enzimas é bastante frágil e pode ser desnaturada pelo calor, pelos ácidos, pelas vitaminas, pelos minerais, pelos metais pesados e por outros agentes oxidantes. Por essa razão existe a preocupação de que as enzimas utilizadas na alimentação animal possam manter o nível de atividade suficiente para se obter resposta significativa. Segundo Acamovic & McCleary (1996) e Jensen (1998), as enzimas exógenas devem ser estáveis durante o armazenamento, compatíveis com minerais, vitaminas e outros microingredientes encontrados no premix; termoestáveis a todas as temperaturas encontradas durante o processo de produção do alimento e, resistentes a variações de pH e atividade proteolítica do trato digestório do animal.

2.4.2. Obtenção das enzimas utilizadas na alimentação animal

As enzimas utilizadas nas rações avícolas são produzidas, industrialmente em laboratórios especializados por meio de culturas aeróbias, sendo derivadas principalmente da fermentação bacteriana, fúngica e de leveduras destacando-se bactérias do gênero *Bacillus* e de fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Fireman & Fireman, 1998).

As principais enzimas disponíveis no mercado são as carboidratases, as proteases e a fitase. Dentre as carboidratases, as xilanases são obtidas a partir do *Trichoderma longibrachiatum*; as β -glucanases são sintetizadas pelos *Bacillus circulans*, *B. subtilis* e o *Penicillium emersonii* e; as amilases são

produzidas principalmente por micro-organismos do gênero *Bacillus* (Vanbelle, 1992; Oliveira, et al., 2007).

2.4.3. Enzimas exógenas para aves: breve histórico

O estudo das enzimas com o objetivo de melhorar o valor nutricional dos alimentos para aves teve início na década de 50, quando um grupo de pesquisadores da Universidade de Washigton/EUA passaram a investigar as razões do baixo desempenho e cama úmida, quando utilizavam determinados cereais, como o trigo, cevada e centeio, nas dietas de frangos de corte. Os pesquisadores verificaram que quando os cereais eram umedecidos antes de serem fornecidos às aves melhoravam o desempenho dos frangos, o que poderia ser devido a liberação de enzimas dos cereais em decorrência do umedecimento, desencadeando a pré-germinação da semente. Posteriormente, a equipe de pesquisadores verificou que o pré-umedecimento poderia ser substituído pela adição de uma amilase microbiana. Na época o alto custo de produção e a baixa estabilidade desta enzima ao calor e às condições adversas no trato digestivo, até atingir o substrato alvo, impediram a aplicação comercial desta descoberta (Graham & Inberr, 1993).

As pesquisas foram se desenvolvendo concentradas, principalmente no desenvolvimento de enzimas que pudessem melhorar o baixo desempenho e cama úmida das aves alimentadas com dietas contendo ingredientes com altos teores de polissacarídeos não amiláceos, como o trigo, a cevada e o centeio, ingredientes bastante utilizados na Europa.

O fato de as enzimas serem muito específicas na sua reação catalítica determina que os produtos que contenham só uma enzima sejam insuficientes para produzir o máximo de benefício como suplemento em dietas

avícolas. Isto sugere que misturas de enzimas ou sistemas multienzimáticos sejam mais efetivos, atuando sobre uma série de polissacarídeos da parede celular dos grãos, levando ao melhor aproveitamento da dieta. Esses complexos seriam mais efetivos em frangos jovens, porque nesta fase, estes ainda não apresentam o desenvolvimento completo do trato gastrointestinal, assim como do seu sistema enzimático (Vanbelle, 1992; Steinfeldt et al., 1998a; Batal & Parsons, 2002; Mourão & Pinheiro, 2009).

Segundo Bedford & Morgan (1996), a utilização de complexos enzimáticos em dietas com matérias primas de alta viscosidade, como trigo, centeio e cevada seria uma rotina na indústria avícola europeia desde a década de 80, apresentando vantagens técnicas e econômicas.

2.4.4. Polissacarídeos não amiláceos

Polissacarídeo é o nome dado à macromolécula constituída de um grande número de monossacarídeos (unidade simples de açúcar) unidos por ligações glicosídicas (IUPAC, 2005).

Os polissacarídeos não amiláceos solúveis (PNAs) são macromoléculas de polímeros de açúcares simples (monossacarídeos) resistentes a hidrólise no trato gastrointestinal de animais não ruminantes devido ao tipo de ligações das unidades de açúcar.

Os PNAs (arabinoxilanos, D-xilanos, β -glucanos, D-mananos, galactomananos, xiloglucanos, entre outras) presentes nas dietas não são digeridos por apresentarem ligações β . As ligações β (1 \rightarrow 4) D glucanos, são resistentes às enzimas de degradação do amido, que possui as ligações α de mais fácil degradação. O trigo apresenta quantidade de arabinoxilanos, seguidos pelo centeio. A cevada tem um alto conteúdo de β -D glucanos, fator

responsável pela sua baixa digestibilidade nas dietas para frangos (Smits & Annison, 1996).

Os arabinoxilanos são polissacarídeos complexos formados pelos açúcares arabinose e xilose em uma estrutura ramificada. Quando em presença de água são facilmente hidratados e se tornam viscosos (Smits & Annison, 1996). A solubilidade e a viscosidade dos PNAs dificultam a interação das enzimas endógenas aos substratos da digesta, influenciando na digestão do amido, gordura e proteína e diminuindo a energia metabolizável das dietas, resultando em baixo desempenho dos animais. A viscosidade também aumenta o tempo de retenção da digesta no TGI das aves, favorecendo a proliferação microbiana intestinal (Langhout et al., 1999; Hubner et al., 2002; Shakouri et al., 2009) e também pode causar alterações na fisiologia e morfologia do trato gastrointestinal (Shakouri et al., 2009).

Chesson (2001) cita alguns dos mecanismos que podem teoricamente aumentar a viscosidade da digesta pela ingestão dos PNAs:

1. Conexão cruzada e oxidativa e formação irreversível do gel;
2. Interações não covalentes entre regiões adjacentes de polímeros de arabinoxilanos altamente ramificados liberados do endosperma e da camada de aleurona e;
3. Alto peso molecular destes polissacarídeos.

2.4.5. Função das enzimas exógenas em dietas

Os efeitos adversos dos arabinoxilanos e glucanos são diminuídos quando esses polímeros são parcialmente hidrolizados. As enzimas glucanases e xilanases causam uma despolimerização parcial dos glucanos e arabinoxilanos, reduzindo a viscosidade do conteúdo intestinal, aumentando

assim a interação das enzimas digestivas com os substratos da dieta, resultando em melhor digestão e absorção de nutrientes (Choct et al., 1999).

Contudo as enzimas também são usadas em dietas com baixa viscosidade, principalmente as amilases. O objetivo com a introdução destas enzimas é melhorar a taxa de digestão do amido no intestino delgado. Noy & Sklan (1995) relatam que em nível de íleo, a digestibilidade do amido raramente é superior a 85%, o que implica em mais amido que não é digerido no intestino delgado (aproximadamente 15%), servindo de fonte energética nos processos de fermentação para os micro-organismos residentes (Jamroz et al., 2002), principalmente nos cecos dos frangos (Van Der Wielen et al., 2000; Ricke, 2003).

2.4.6. Fatores que afetam a eficiência das enzimas

Além da especificidade enzima/substrato, o tipo de cereal incluído na dieta, o nível de enzima administrado à ração e a idade das aves são fatores que podem influenciar a eficiência das enzimas em dietas para aves.

A composição de nutrientes e fatores antinutricionais pode variar muito de um cereal para outro. O trigo, por exemplo, apresenta uma grande quantidade de PNAs em sua composição. Quando introduzido nas dietas, geralmente aumenta a viscosidade da digesta, baixando a digestibilidade da dieta e o desempenho dos animais. Já no milho a presença de PNAs é bem menor e os efeitos adversos são menos intensos, o que o torna mais digestível em relação ao trigo. Essa característica favorece a eficiência das enzimas exógenas para dietas com farelo de trigo, pois o percentual de digestibilidade do milho já é alto, assim a margem de aumento conseguida com a introdução de enzimas se torna menor (Amerah et al., 2008) em relação a digestibilidade

do trigo.

A origem do cereal, bem como a cultivar também pode afetar a digestibilidade e a eficiência da dieta (Ravindram et al. 2006). Condições de solo, clima e estação do ano pode caracterizar um maior ou menor nível de fatores antinutricionais presente nos cereais (Çiftci et al., 2003).

Além disso, a idade também tem um efeito importante na eficiência da enzima. Segundo Nitsan et al. (1991) e Noy & Sklan (1997) as aves jovens apresentam limitações das atividades das enzimas digestivas e das funções do trato gastrointestinal, contudo a medida que crescem aumenta a produção das enzimas endógenas, aumentando também a absorção de aminoácidos e energia pelo desenvolvimento do trato gastrintestinal (Noy & Sklan, 1995). Olukosi et al. (2007) observaram uma maior retenção da matéria seca, energia e nitrogênio com o aumento da idade. Eles concluíram que os frangos jovens são mais beneficiados com a ação das enzimas, já que em aves mais velhas a retenção de nutrientes diminui e a eficiência das enzimas exógenas fica menos evidente. Steinfeldt et al. (1998a) e Zhou et al. (2009) também verificaram uma maior digestibilidade da dieta e um maior desempenho zootécnico das aves alimentadas com enzimas incluídas às dietas, porém esse efeito foi mais pronunciado nas aves jovens.

2.4.7. Efeito das enzimas exógenas nas dietas

Zanella et al. (1999), observaram melhoria no ganho de peso e na conversão alimentar de 1,9 e 2,2%, respectivamente, em dietas a base de milho/farelo de soja, quando uma mistura de xilanase, amilase e protease foi introduzida a dieta. Os autores Steinfeldt et al. (1998b) e Garcia et al. (2008) também constataram melhora na conversão alimentar e diminuição da

viscosidade intestinal em dietas com trigo/farelo de soja, quando as enzimas xilanase e β -glucanase foram adicionadas à dieta.

Wyatt & Bedford (1998), investigaram a resposta da energia metabolizável à suplementação da mistura das enzimas protease e amilase, substituindo diretamente a gordura adicionada por milho (reduzindo os níveis totais de energia). A substituição direta da gordura pelo milho diminuiu os níveis de energia em 3,9% na dieta inicial e aproximadamente 9% nas dietas de crescimento e terminação (3150 contra 3030 kcal/kg, inicial; 3320 contra 3049 kcal/kg, crescimento; 3370 contra 3090 kcal/kg, terminação). A redução de energia não teve efeito sobre o peso vivo final e a conversão alimentar, promovendo um desempenho semelhante às aves em relação as que receberam a dieta padrão. Estes resultados demonstram que o uso adequado de enzimas pode liberar energia de dietas milho/farelo de soja, resultando num desempenho equivalente à dieta de alta energia e custo de ração por kg de carne mais barato.

Zanella et al. (1999), observaram redução na atividade endógena das enzimas pancreáticas, amilase e tripsina em frangos de 21 dias de idade, alimentados com dietas suplementadas com enzimas exógenas amilase e protease. Os autores concluíram que a inclusão de enzimas exógenas nas dietas avícolas reduz a síntese de enzimas endógenas. Em consequência, o organismo tem a disposição mais aminoácidos para a síntese proteica. De acordo com Garcia (1997), em situações normais, aproximadamente 25% das necessidades diárias de nitrogênio podem ser destinadas para síntese de enzimas endógenas.

Mathlouthi et al. (2002) avaliaram o efeito da adição de xilanase e β -

glucanase sobre o desempenho, a digestibilidade dos nutrientes, as condições físico-químicas do intestino e a microbiota cecal de frangos de corte alimentados com dietas a base de milho, arroz e cevada. Os autores observaram melhora na digestibilidade dos nutrientes através da melhora da energia metabolizável aparente.

Wang et al. (2005) avaliando dietas a base de trigo com suplementação de xilanase e β -glucanase verificaram efeito das enzimas no desempenho (ganho de peso e conversão alimentar) e na digestibilidade da proteína bruta e na EMA, aumentando significativamente os valores destas variáveis. Além disso, a inclusão das enzimas promoveu uma diminuição no tamanho dos órgãos e do trato gastrointestinal (o peso de cada segmento diminuiu linearmente- $P<0,05$ -) e um aumento na produção de ácidos graxos voláteis.

Józefiak et al. (2007), pesquisando o efeito da suplementação de xilanase em dietas com trigo, triticale e arroz verificaram que a viscosidade da dieta e o peso relativo dos cecos diminuíram com introdução da enzima, mas houve uma maior fermentação microbiana (maior produção de ácidos graxos voláteis) nas dietas com arroz.

Gao et al. (2008) avaliando dietas a base de trigo/milho/farelo de soja verificaram um aumento no desempenho dos animais, uma diminuição no peso relativo do duodeno, jejuno, pâncreas aos 21 dias de idade e dos cecos aos 49 dias, quando a mistura das enzimas xilanase, β -glucanase, celulase e pectinase) foram introduzidas às dietas. Essas enzimas também promoveram um maior pH do conteúdo do duodeno e jejuno aos 21 dias e um menor pH dos cecos aos 49 dias.

Zhou et al. (2009) avaliando dietas a base de farelo de trigo e milho com diferentes níveis de energia metabolizável (12,55, 12,30, 12,05, 11,80 e 11,55 MJ/kg) nas fases inicial, crescimento e terminação, verificaram que a metabolizabilidade da matéria seca diminuiu significativamente com a redução da energia metabolizável (EM) das dietas inicial e de crescimento, mas a adição da mistura com enzimas xilanase, α -amilase e protease às dietas proporcionou aumento desta variável em todas as dietas e fases analisadas. Contudo o maior aumento foi obtido com o menor nível de energia metabolizável. A energia metabolizável aparente (EMA) também diminuiu linearmente, com a redução do nível de EM da dieta, para as fases inicial, crescimento e terminação, mas aumentou em todas as fases com a introdução das enzimas. Contudo, o maior aumento para esta variável foi obtido com 11,55 MJ/kg de EM na fase inicial. A retenção da proteína bruta (PB) aumentou pela suplementação com enzima nas dietas com os níveis de EM de 11,55 e 11,80 MJ/kg. Os autores concluíram que o nível de energia metabolizável da dieta afetou a metabolizabilidade da MS, PB e a EMA e a suplementação com enzimas aumentou a metabolizabilidade destas variáveis e da EMA, sendo esta melhoria mais pronunciada nas dietas com menor EM.

4. HIPÓTESES

Neste trabalho as seguintes hipóteses foram estabelecidas para identificar o efeito de aditivos em dietas para frangos de corte:

a) Dietas com probiótico ou óleos essenciais melhoram o desempenho e a saúde intestinal;

b) Dietas com probiótico e/ou enzimas melhoram o desempenho e diminuem os parâmetros de morfometria e pH do TGI; aumentam parâmetros de metabolizabilidade e digestibilidade da dieta e reduzem a produção de resíduos para o ambiente. Além disso, são capazes de alterar a microbiota do lúmen ileal.

5. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar em dietas para frangos de corte, o efeito do probiótico a base de *Enterococcus faecium*, do composto dos óleos essenciais extraídos de tomilho e cravo-da-índia e da mistura das enzimas xilanase, amilase e β -glucanase sobre parâmetros produtivos e sanitários.

CAPÍTULO II

**Integridade intestinal e desempenho de frangos corte sob estresse
infeccioso**

Intestinal integrity and performance of broilers under infectious stress

I. I. Santos, A. M. Kessler, J. F. Mendes, M. F. Gianfelici, R. V. Labres

RESUMO

Considerando a melhora na produtividade animal e a ação trófica de alguns aditivos sobre a saúde intestinal, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes aditivos sobre a integridade, a morfometria intestinal e o desempenho de frangos de corte, sob condições de estresse infeccioso por *Eimerias sp.* Utilizou-se 240 frangos Cobb de 1 dia de idade e 4 dietas experimentais: Dieta controle sem aditivo, probiótico, óleos essenciais e antibiótico. Avaliou-se o ganho de peso (GP), o consumo de ração (CR) e a conversão alimentar (CA); os escores de lesão; a altura, largura e densidade de vilos, profundidade de cripta (PC) e a relação vilos:cripta (V:C) nos segmentos intestinais. Aos 28 dias de idade foi encontrado nos animais que consumiram óleos essenciais um maior ($P<0,05$) escore de lesão em relação aos demais. Aos 21 e 28 dias, uma menor PC e maior ($P<0,05$) relação V:C foram verificados nos animais que receberam antibiótico na dieta. As dietas com probiótico e antibiótico possibilitaram um maior ($P<0,05$) CR e GP aos 21 dias em relação as demais dietas. Porém, somente os animais que receberam as dietas com antibióticos e controle apresentaram melhor ($P<0,05$) CA. Aos 28 dias de idade os animais que consumiram antibiótico na dieta apresentaram

uma CA melhor ($P < 0,05$) do que aqueles que receberam a dieta com óleo essencial. Com exceção do CR aos 21 dias, as dietas analisadas não melhoraram ($P > 0,05$) o desempenho e o escore de lesão dos animais em relação à dieta controle. Contudo, a dieta com antibiótico diminuiu significativamente a PC e aumentou ($P < 0,05$) a relação vilos:cripta, indicando melhor eficiência digestiva para os animais.

Palavras chave: Antibiótico; cripta; probiótico; óleos essenciais

ABSTRACT

Some additives are considerate to able to improve the trophic action of some additives about intestinal health the animal production. This paper aims at evaluating the influence of different additives around intestinal performance and morphometry from broilers under infectious stress by *Eimerias sp.* 240 day-old broiler chickens Cobb and 4 trials (Control diet , probiotic, mix of essential oil and antibiotic) were used. The weight gain (WG), feed intake (FI), feed conversion (FC) and villus height, breadth and density and depth cripts (DC) and the relation of villus hight:depth crypt (V:D) from intestinal segments were evaluated. The essential oils diet in the 28 days-old yielded major ($P < 0,05$) lesion scores in relation to other diets. A minor DC and major relation V:D were found in animals from antibiotic diet in the 21 and 28 days-old. The probiotic and antibiot diets in the 21 days promoted a larger FI and WG in relation the other diets. This WG was significantly larger than the WG form animals of essential oils diet. But only animals that received antibiotic and control diet presented an major ($P < 0,05$) FC. With exception of FI in the 21 days the diets do not improve ($P > 0,05$) the performance and lesion scores of animals in relation to control diet.

However, the antibiotic diet decreased significantly the CD and increased ($P < 0,05$) the V:D relation suggesting better digestive efficiency for animals.

Keywords: antibiotic; cript; essential oils; probiotic; villus

INTRODUÇÃO

A sobrevivência e o bom desempenho das aves dependem da forma como o organismo animal obtém energia e compostos químicos. Para uma obtenção adequada, é necessário que o trato digestório apresente características estruturais funcionais desde a ingestão dos alimentos até a sua absorção (Romer & Parsons, 1981).

A absorção está intimamente relacionada aos processos ocorridos na mucosa intestinal. O desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de eventos citológicos e perdas por descamação envolvendo as criptas e os vilos (Uni et al., 1998; Uni, 2000. Segundo Yamauchi & Ishiki (1991), a densidade de vilos é diferente nas várias porções intestinais (duodeno, jejuno e íleo). De acordo com Macari (1999) o número de vilosidades e seu tamanho, bem como o de microvilos, em cada segmento do intestino delgado, conferem a eles características próprias, sendo que na presença de nutrientes a capacidade absorptiva do segmento será diretamente proporcional ao número de vilosidades ali presentes, tamanho dos vilos e área de superfície disponível para a absorção.

Normalmente, o epitélio intestinal age como uma barreira natural contra bactérias patogênicas e substâncias tóxicas presentes na luz intestinal. Distúrbios na população microbiana normal ou nas células epiteliais intestinais, causados por algum tipo de estresse, patógenos e substâncias químicas podem

alterar a permeabilidade desta barreira natural, facilitando a invasão de patógenos e outras substâncias nocivas, modificando o metabolismo, a capacidade de digestão e absorção de nutrientes e causando ainda inflamações crônicas na mucosa intestinal (Hofstad, 1972; Podolsky, 1993). Conseqüentemente ocorre diminuição das vilosidades, aumento do turnover celular e diminuição da atividade digestiva e absorptiva (Vissek, 1978).

Como os processos de absorção de nutrientes são totalmente dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal, a manipulação de micro-organismos probióticos, substâncias antibióticas e óleos essenciais dentro do trato gastrointestinal, têm sido usada com o objetivo de melhorias no desempenho e, conseqüentemente na eficiência energética no intestino (Bradley et al., 1994; Pelicano et al., 2003; Miles et al., 2006).

A competição entre bactérias e hospedeiro por nutrientes e a formação de metabólitos depressores do crescimento no intestino podem ter efeitos negativos sobre a mucosa intestinal. Acredita-se que a inibição da atividade microbiana pelos antibióticos e óleos essenciais reduz a competição com o hospedeiro por nutrientes e a produção de metabólitos depressores do crescimento (Ravindran et al., 1984; Apajalahti et al., 2004). A adição de antibióticos ao alimento em baixos níveis é prática comum na produção de aves e melhora o ganho de peso e a eficiência alimentar em torno de 1 a 5% (Thomke & Elwinger, 1998). Os antibióticos controlam e limitam não só o crescimento de micro-organismos prejudiciais às aves, mas também de bactérias não-patogênicas incluindo lactobacilos, bifidobactérias, bacteróides e enterococos e, reduzem a produção de antagonistas microbianos como a amônia que afeta adversamente a fisiologia do hospedeiro (Ferket, 2002).

A microbiota do TGI desempenha importante papel na manutenção da saúde do hospedeiro. Os benefícios da ingestão de probióticos incluem a produção de substâncias antimicrobianas e ácidos orgânicos, proteção aos vilos e superfícies absortivas contra toxinas de patógenos, bem como estímulo ao sistema imune (Vicent, 1959; Dobrogosz et al., 1991; Walker & Duff, 1998). De acordo com alguns autores, a utilização dos probióticos possibilita a colonização do trato digestivo, mantendo ou incrementando a população microbiana natural, prevenindo a colonização de microrganismos patogênicos (Fuller, 1989; Vanbelle et al., 1990; Houdijk et al., 1999).

Relatos de Cook & Bird (1973) indicam que aves criadas em ambientes livres de patógenos apresentam uma redução na altura de vilos, bem como na profundidade de cripta, sugerindo que o crescimento normal do epitélio intestinal dependa também do equilíbrio da microbiota ali residente. Assim, a integridade da mucosa do trato gastrointestinal confere ao frango de corte condições adequadas para a digestão e absorção dos nutrientes.

Nos últimos anos, o emprego de micro-organismos intestinais e substâncias antimicrobianas (bacitracina metileno dissalicilato e óleos essenciais) têm proporcionado bons resultados na nutrição das aves, principalmente em condições experimentais. Porém, respostas diferentes são encontradas em testes realizados a campo, segundo as distintas condições de criação. A manutenção do ambiente de conforto térmico e os níveis de contaminação das dietas, das instalações e dos equipamentos não são totalmente controlados dentro das unidades produtivas. Visando experimentar uma situação de desvio das condições ideais de manejo, propõe-se neste trabalho, um estresse infeccioso por *Eimerias* sp. Foram avaliados os efeitos de

um micro-organismo intestinal (probiótico) e substâncias antimicrobianas (bacitracina metileno dissalicilato-BMD e óleos essenciais) sobre a integridade da mucosa, morfometria intestinal e o desempenho de frangos de corte aos 14, 21 e 28 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO)/UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. A fase de campo e o abate dos animais foram realizados nas dependências do setor de avicultura do LEZO e as análises laboratoriais nos Laboratórios de Anatomia Patológica-Faculdade de Veterinária/UFRGS e Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS.

O experimento foi conduzido com 240 frangos, machos Cobb. No primeiro dia de idade, os animais foram pesados e alojados num total de 12 aves por gaiola. O peso dos animais por gaiola foi equalizado mantendo-se a variabilidade máxima de $\pm 5\%$ entre as médias. A temperatura ambiental e a umidade relativa do ar foram controladas e registradas diariamente. O abastecimento dos comedouros com ração foi feito através de conchas específicas para cada tratamento tomando-se, o devido cuidado para que os micro-organismos de um tratamento não contaminassem o outro, sendo este mesmo procedimento adotado com o material de limpeza necessário para a lavagem dos bebedouros. Os animais receberam durante todo o período experimental água clorada e ração (a base de milho e farelo de soja) *ad libitum*, sendo este período dividido em duas fases: inicial (1 a 21 dias), onde as aves receberam uma dieta contendo 3050 kcal de energia metabolizável por kg de

ração, 21% de proteína bruta, 1,29% de lisina, 0,57% de metionina, 0,5% de monensina, 0,95% de Ca e 0,45% de P disponível; e na fase de crescimento (22 a 28 dias), as aves receberam uma dieta contendo 3150 kcal de energia metabolizável por kg de ração, 20% de proteína bruta, 1,20% de lisina, 0,53% de metionina, 0,5% de monensina, 0,90% de Ca e 0,42% de P disponível. Os demais níveis nutricionais foram aqueles recomendados por Rostagno et al. (2005).

Os animais foram pesados semanalmente e avaliou-se o ganho de peso (GP), o consumo de ração (CR) e a conversão alimentar (CA).

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, constituído por 4 dietas: 1-Controle negativo, sem aditivo melhorador de crescimento; 2-Probiótico ($3,5 \times 10^{10}$ UFC/g de *Enterococcus faecium* - 35g/ton); 3- Óleos essenciais (extraído a partir de plantas de tomilho e cravo-da-índia - 100g/ton) e; 4- Controle positivo constituído pelo antibiótico Bacitracina Metileno Dissalicilato 11% (BMD 11% - 200g/ton).

Para o desafio com eimerias, os pintinhos foram inoculados, individualmente, via intra-esofágica, aos 15 dias de idade, com solução contendo 10×10^3 oocistos de *Eimeria acervulina* e 5×10^3 oocistos de *Eimeria maxima*.

Aos 14, 21 e 28 dias de idade, após jejum de 12 horas, foi realizado o abate de 5 aves por tratamento para a avaliação de escores de lesão, segundo Johnson & Reid (1970) e a coleta dos diferentes segmentos do intestino delgado para as análises de morfometria.

As amostras do duodeno, jejuno e íleo foram fixadas em formalina tamponada a 10%, cortadas transversalmente, colocadas paralelamente em

cassetes, processados em aparelho histotécnico e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 3 a 5 micrômetros foram obtidos em micrótomo rotatório e corados com hematoxilina-eosina (Prophet et al., 1992).

Nos diferentes períodos (14, 21 e 28 dias de idade) cinco lâminas por tratamento foram feitas para cada segmento do intestino delgado. De cada lâmina foram efetuadas seis medidas de altura de vilos (AV), comprimento de vilos (CV), largura de vilos (LV), densidade de vilos (DV) e profundidade de cripta (PC), utilizando-se uma objetiva de duas vezes de aumento e uma régua acoplada à lente. Os resultados das leituras foram multiplicados por um fator de correção, para obtenção do valor em micrômetro. A altura de vilos foi medida a partir da região basal dos vilos, coincidente com a porção superior das criptas, até seu ápice. As criptas foram medidas da sua base até a região de transição entre a cripta e os vilos.

O estudo morfométrico foi realizado através do sistema analisador de imagem (Image-Pro plus 6.0) acoplado a um microscópio binocular.

Os dados de desempenho (GP, CR e CA), morfometria (DV, LV, AV, PC e a relação v:c) e escore de lesão foram submetidos à análise de variância pelo pacote estatístico SPSS (2006) e na presença de diferença significativa foi realizada a comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) ou Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estresse infeccioso

Aos 14 dias de idade, foi analisada a saúde intestinal das aves e não se constatou qualquer lesão. Logo após, os animais receberam via esofágica a

inoculação de oocistos de *Eimerias acervulina* e *maxima*.

Aos 21 dias de idade observou-se que as lesões eram menos presentes no grupo que recebeu antibiótico. No entanto, não se encontrou diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos (Tab. 1).

Aos 28 dias os escores médios foram mais baixos que aos 21 dias, mostrando uma recuperação contra a infecção. Porém, encontrou-se uma diferença significativa ($P<0,05$) no escore de lesão provocado por *Eimeria máxima* para os animais que receberam a dieta com óleos essenciais. Contudo esses animais não se diferiram daqueles que receberam a dieta controle e probiótico. Ao contrário do que foi encontrado por Giannenas et al. (2003), Oviedo-Rondón et al. (2006) e Silva et al. (2009), o grupo com óleo essencial apresentou um maior escore de lesão em relação aos grupos das demais dietas, indicando uma capacidade de recuperação menor ao estresse infeccioso (Tab. 1).

Tabela 1- Escore de lesão em frangos de corte sob estresse infeccioso por *Eimeria maxima* e *E. acervulina* aos 21 e 28 dias de idade.

Tratamentos	<i>Eimeria maxima</i>				<i>Eimeria acervulina</i>			
	21 dias		28 dias		21 dias		28 dias	
Controle	1,2 ¹	13,50 ²	0,4	9,0 ^{ab}	0,8	11,25	0,4	9,0
Probiótico ³	1,3	14,75	0,4	9,0 ^{ab}	0,8	11,25	0,4	9,0
Óleo essencial	1,4	15,75	0,5	11,5 ^b	0,4	11,0	0,4	8,0
Antibiótico ⁴	0,6	12,25	0,2	7,75 ^a	0,0	10,25	0,4	8,0
Probabilidades	0,149		0,036		0,672		1,0	
CV%	3,50		3,30		2,8		2,5	

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$); ¹Valores médios de escore de lesão; ²valores médios ranqueados de escore de lesão; Utilizou-se a análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis para análise dos dados; ³*Enterococcus faecium* ($3,5 \times 10^{10}$ UFC/g); ⁴BMD 11%; CV: coeficiente de variação.

Morfometria intestinal

A maioria dos processos digestivos e de absorção ocorre no intestino delgado e parte da digestão ocorre na superfície das vilosidades. A máxima capacidade da digestão e absorção acontece quando o animal apresenta uma grande área luminal, com altas vilosidades e enterócitos maduros (Macari, 1999). Sendo assim, parâmetros morfométricos como altura, largura e densidade de vilos e profundidade de criptas são importantes indicadores da saúde digestiva e capacidade de absorção na mucosa intestinal.

No presente trabalho, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) para altura, densidade e largura de vilos em nenhum segmento intestinal das aves aos 14, 21 e 28 dias de idade. No entanto, foram verificadas diferenças significativas na profundidade de cripta (PC) e na relação vilos:cripta (V:C) no íleo aos 21 e 28 dias (Tab. 2).

A cripta é uma área onde as células totipotentes se dividem dando origem a reposição de enterócitos nos vilos. A profundidade de cripta é um indicativo do intenso turnover existente nos vilos em resposta a perda de células pela descamação ou inflamações de patógenos e toxinas produzidas por eles. Quando a intensidade do turnover é aumentada mais energia da dieta é requerida, ficando menos disponível para o crescimento do animal. A grande massa de tecido do intestino protege o corpo da entrada de patógeno, mas requer mais energia e/ou proteína para sua manutenção. A adição de antibiótico na dieta diminui a população microbiana e a quantidade de inflamações provocadas por ela (Walton, 1988). Neste trabalho o grupo que recebeu antibiótico na dieta apresentou menor PC ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos analisados. Miles et al. (2006) avaliando os antibióticos virginimicina e

BMD na dieta de frangos de corte, reportaram que no íleo de animais com uma semana de idade houve uma diminuição na profundidade de cripta em relação a dieta controle. Mas, não encontrou diferença significativa entre todos os tratamentos na terceira semana de idade.

A relação V:C também é um indicador da capacidade digestiva do intestino delgado. Um aumento nesta relação corresponde a uma melhor digestão e absorção (Montagne et al., 2003). No presente trabalho, o grupo com antibiótico apresentou uma maior relação V:C, indicando para os animais deste grupo uma melhor eficiência digestiva. Esses resultados diferem um pouco daqueles encontrados por Silva et al. (2009). Esses autores verificaram que os animais da dieta com antibiótico apresentaram uma relação V:C significativamente maior quando comparados ao grupo da dieta controle. Porém, não apresentaram diferenças ($P>0,05$) morfométricas em relação àqueles que receberam a dieta com óleo essencial.

Tabela 2 – Parâmetros de morfometria (em μm) do íleo de frangos de corte sob estresse infeccioso por *Eimerias sp.*

Tratamentos	21 dias			28dias		
	AV (μm)	PC (μm)	V:C	AV (μm)	PC (μm)	V:C
Controle	730,20	175,25 ^a	4,17 ^b	1015,83	283,36 ^a	3,59 ^b
Probiótico ¹	733,97	177,94 ^a	4,12 ^b	1021,59	286,00 ^a	3,57 ^b
Óleo Essencial	728,73	175,50 ^a	4,16 ^b	1016,61	286,63 ^a	3,56 ^b
Antibiótico ²	814,25	151,83 ^b	5,36 ^a	1025,65	247,12 ^b	4,15 ^a
Probabilidades	0,416	0,037	0,001	0,998	0,004	0,019
CV%	12,38	10,10	15,51	8,09	8,33	10,48

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ¹ *Enterococcus* ($3,5 \times 10^{10}$ UFC/g); ² BMD 11%; CV: coeficiente de variação; AV: altura de vilos; PC: profundidade de cripta; V:C: relação vilos cripta.

Desempenho zootécnico

Até 14 dias de idade os animais não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros de desempenho entre as dietas analisadas. No período de 14 a 21 dias (Tab. 3), as dietas com probiótico e antibiótico resultaram num maior ($P<0,05$) CR e GP. Esse GP foi significativamente maior que do que o encontrado para os animais da dieta com óleo essencial e controle. Os animais que receberam as dietas com antibiótico e controle apresentaram uma melhor ($P<0,05$) CA. O melhor desempenho dos animais que receberam a dieta com antibiótico pode estar associado aos resultados de escore de lesão e morfometria. Diferente ($P<0,05$) do grupo com óleo essencial na dieta, os animais que receberam antibiótico obtiveram menor escore de lesão no epitélio intestinal e melhor resposta à sua recuperação, assim como menor PC e maior relação V:C, indicando melhor eficiência digestiva. Santos et al. (2009) comparando dietas semelhantes em frangos sob estresse infeccioso, não encontraram diferença significativa de desempenho aos 21 dias. No entanto, diferenças significativas de desempenho e morfometria foram verificadas no período de 1 a 35 dias.

No período de 22 a 28 dias (Tab. 3), não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) de GP e CR entre nenhum dos tratamentos analisados. Porém, pode-se observar um resultado melhor ($P<0,05$) de CA para os animais que receberam a dieta com antibiótico, quando comparados com aqueles da dieta com óleo essencial. Esses resultados diferem dos encontrados por Mathis & Scicutella (2007), que não observaram diferenças ($P<0,05$) de desempenho entre as dietas com BMD e óleos essenciais.

Dietas com óleo essencial costumam apresentar um efeito

antibiótico, principalmente coccidiano (Manzanilla et al., 2004; Mathis & Scicutella, 2007; Silva et al., 2009). As piores respostas, nos parâmetros escore de lesão e morfometria, encontrados no presente trabalho podem ter determinado as baixas ($P < 0,05$) respostas de desempenho dos animais do grupo que consumiu dieta com óleo essencial.

Além dos animais da dieta com óleo essencial, os animais da dieta com probiótico também mostraram uma pior CA aos 21 dias de idade, porém diferentemente dos primeiros, estes melhoraram significativamente aos 28 dias, obtendo um resultado significativamente semelhante aos animais que receberam antibiótico na dieta (Tab. 3). Resultados semelhante foram encontrados por Mountzouris et al. (2007) que não observaram diferença significativa na CA entre os animais da dieta com probiótico e antibiótico. No entanto, Gao et al. (2009) constataram que o uso de probiótico melhorou a resposta imune e o desempenho dos animais infectados por coccídios.

Tabela 3- Desempenho zootécnico de frangos de corte nos períodos de 14 a 21 e de 22 a 28 dias de idade.

Tratamentos	14 a 21 dias			22 a 28 dias		
	GP (g)	CR (g)	CA	GP (g)	CR (g)	CA
Controle	515,64 ^{bc}	692,33 ^b	1,34 ^a	523,71	897,07	1,72 ^{ab}
Probiótico ¹	523,58 ^{ab}	725,64 ^a	1,39 ^b	530,11	912,17	1,72 ^{ab}
Óleo essencial	492,64 ^c	683,85 ^b	1,39 ^b	522,16	915,64	1,75 ^b
Antibiótico ²	547,51 ^a	733,06 ^a	1,34 ^a	533,93	908,02	1,69 ^a
Probabilidades	<0,001	0,002	<0,001	0,414	0,377	0,014
CV%	4,71	3,85	17,65	2,33	1,91	1,86

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ¹*Enterococcus* ($3,5 \times 10^{10}$ UFC/g); ²BMD 11%; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CV: coeficiente de variação.

CONCLUSÃO

Com exceção do GP e do CR aos 21 dias de idade, as dietas com probiótico, óleo essencial e antibiótico, não melhoraram significativamente o desempenho e o nível de lesões dos animais em relação àqueles que receberam a dieta controle. Contudo, a dieta com antibiótico diminuiu significativamente a PC e aumentou ($P < 0,05$) a relação vilos:cripta, indicando melhor eficiência digestiva para os animais.

BIBLIOGRAFIA

- APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.60, p.223–232, 2004.
- BRADLEY, G. L.; SAVAGE, T. F.; TIMM, K. I. The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poultry performance and ileal morphology. **Poultry Science**, Champaign, v.73, p.766-1770, 1994.

- COOK, R. H.; BIRD, F. H. Duodenal villus area and epithelial cellular migration in convention and germ-free chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.52, p.2276-2280, 1973.
- DOBROGSZ, W. J.; BLACK, B. L. E; CASAS, I. A. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, Champaign, v.70, p.158, 1991.
- FERKET, P. R.; PARKS, C. W.; GRIMES, J. L. (2002). Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. **Proceedings of Multi-State Poultry Feeding and Nutrition Conference**, Indianapolis, USA, p. 14-16. Disponível em: <<http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate/Proceedings.Multi-tate%20MeetingFerket.pdf>> Acesso: 02/12/2009.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.
- GAO, J.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; YU, S. H.; YOON, I.; MOORE, D.; GAO, I. P.; YAN, H. J.; QI, G. H. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. **Poultry Science**, Champaign, v.88, n.10, p.2141-2151, 2009.
- GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N. A.; SPAIS, A. B. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives of Animal Nutrition**, Cambridge, v.57, p.99-106, 2003.
- HOFSTAD, M. S. **Diseases of poultry**. 6 ed. Hofstad, M.S. (ed). Ames: The Iowa State University Press, 1972, 1176 p.

- HOUDIJK, J. G. M.; BOSCH, M. W.; TAMMINGA, S. Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. **Journal of Animal Science**, Bethesda, v.77, p.148-158, 1999.
- JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial Drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen Experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, Oxford, v.28, p.30-36, 1970.
- MACARI, M. **Fisiologia do Sistema Digestivo das Aves (I)**. Aves e Ovos, v.15, n.8/9, 2-20 p, 1999.
- MANZANILLA, E. G.; PERES, J. F.; MARTIN, M.; KAMEL, C.; BAUCCELLS, F.; GASA, J. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Bethesda, v.82, p.3210–3218, 2004.
- MATHIS, G.; SCICUTELLA, N. A comparison of performance of coccidia vaccinated broilers fed RepaXol, AciXol, or Bacitracin Methylene Disalicylate. **Journal of Dairy Science**, Davis, v.90, n.1, p.131, 2007.
- MILES, R. D.; BUTCHER, G. D.; HENRY, P. R.; LITTELL, C. R. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. **Poultry Science**, Champaign, v.85, p.476-485, 2006.
- MONTAGNE, L; PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.108, p.95-117, 2003.
- MOUNTZOURIS, K. C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.;

- SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. **Poultry Science**, Champaign, v.86, p.309–317, 2007.
- OVIEDO-RONDON, E. O.; CLEMENTE-HERNANDEZ, P.; SALVADOR, F.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Essential oils on mixed coccidia vaccination and infection in broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.5, n.8, p.723-730, p. 2006.
- PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.98, n.547, p.124-134, 2003.
- PODOLSKY, D. K. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. **American Journal of Physiologic**, Bethesda, v.264, p.179-186, 1993.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, Washington, 1992. 279p.
- RAVINDRAN, V.; KORNEGEY, E. T.; JR WEBB, K. E. Effects of fiber and virginiamycin on nutrient absorption, nutrient retention and rate of passage in growing swine. **Journal of Animal Science**, Bethesda, v.59, p.400-408, 1984.
- ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia Comparada**. Ed. México:

Iberoamericana. 1981. 428p.

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.

Tabelas brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais. 2ª edição-Viçosa: UFV, 2005. 186 p.

SANTOS, I. I.; KESSLER, A. M.; MENDES, J. F.; LABRES, R. V. Aditivos melhoradores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte desafiados por coccídios. In: 21 Congresso Brasileiro de Avicultura e 27 Conferência FACTA, 2009, Porto Alegre. **Anais do Prêmio Lamas 2009.** Campinas : FACTA, 2009. (CD-ROM).

SILVA, M. A.; PESSOTTI, B. M. S.; COLNAGO, G. L.; RODRIGUES, M. R. A.; NUNES, C. L.; ZANINI, M. S.; MARTINS, I. V. F. Intestinal mucosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of oregano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1471-1477, 2009.

STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES (SPSS). Version 15.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

THOMKE, S.; ELWINGER, K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. I. Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants. **Annales de Zootechnie**, Paris, v.47, p.85-97, 1998.

UNI, Z. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chickens small intestine. **British Poultry Science**, Cambridge, v.41, p.410-415, 2000.

UNI, Z.; GANOT, S.; SJLAN, D. Posthach development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, Champaing, v.77, p.75-82,

p.1998.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, Cambridge, v.40, p.477-484, 1990.

VICENT, J. G. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.78, p.477-484, 1959.

VISEK, W. J. The mode of growth promotion by antibiotics. **Journal of Animal Science**, Bethesda, v.46, p.1447-1469, 1978.

WALKER, W. A.; DUFF, L. C. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. **Journal Nutrition Biochemical**, Berlin, v.9, p.668-675, 1998.

WALTON, J. R. The modes of action and safety aspects of growth promoting agents. in **Proceedings of Maryland Nutrition Conference**, University of Maryland, College Park, MD.92–97p. 1988.

YAMAUCHI K. E.; ISHIKI, Y. Scanning electron microscopic observations on the intestinal villi in growing White Leghorn and broiler chickens from 1 to 30 days of age. **British Poultry Science**, Cambridge, v.32, p.67-78, 1991.

CAPÍTULO III

Probiótico e enzimas em dietas com dois níveis de energia: parâmetros produtivos e intestinais de frangos de corte

Probiotic and enzymes in diets with two energy levels: productive and intestinal parameters of broilers

I. I. Santos, A. M. Kessler, G. Corção, J. F. Mendes, R. V. Kras

RESUMO

Neste trabalho foram utilizados frangos machos Ross para avaliar o efeito de probiótico e enzimas em dietas com dois níveis de energia, nos períodos de 11 a 14 e 32 a 35 dias de idade. A dieta com o nível padrão de energia (EP) foi baseada em milho e farelo de soja e a dieta de baixa energia (BE) com milho e os farelos de soja e trigo. Cada nível de energia recebeu quatro tratamentos: Sem aditivo; enzimas xilanase, amilase e β -glucanase; probiótico *Enterococcus faecium* e; enzimas com o probiótico utilizados nos demais tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e cada tratamento teve 5 repetições de 12 aves no primeiro período e 8 no segundo. Calculou-se o efeito sob o desempenho, a morfometria e o pH do TGI de frangos de corte. Os frangos alimentados com as dietas de BE consumiram mais ($P < 0,001$) ração em ambos os períodos, expressando um menor ($P < 0,05$) ganho de peso no período inicial e uma pior conversão alimentar nos dois períodos. Houve efeito da energia para os parâmetros de morfometria e pH. As dietas com BE apresentaram uma diminuição significativa do pH e aumentaram o comprimento e o peso da moela aos 14 dias e do ceco esquerdo aos 14 e 35

dias de idade. No entanto, nestas dietas, a adição das enzimas isoladas e em combinação com o probiótico diminuiu significativamente o comprimento e o peso do ceco esquerdo aos 14 dias. Conclui-se que as dietas com baixa energia reduzem o desempenho e o pH dos cecos dos frangos de corte e aumentam os parâmetros de morfometria. Porém, a presença das enzimas isoladas e em combinação com o probiótico nas dietas de baixa energia é capaz de reduzir o comprimento e peso do ceco esquerdo aos 14 dias de idade das aves.

Palavras chave: Amilase; desempenho; pH; trigo; xilanase

ABSTRACT

This study used Ross male broiler chickens to evaluate the effect of probiotic and enzymes in diets with two energy levels from 11 to 14 and from 32 to 35 days-old. The (LE) low energy diet was based on corn, soybean meal and wheat bran and standard energy level with corn and soy. Each energy levels received 4 treatments: Without additive; enzymes xylanase, amylase and β -glucanase; *Enterococcus faecium* probiotic and; mix of the enzymes and probiotic used in the other treatments. The experimental design was completely randomized and each treatment received 5 repetitions of 12 birds in the first period and 8 birds in the second period. The effect on growth performance, TGI and ceaca morphometry and pH were calculated. The poultry feed with LE diets consumed more ($P < 0,001$) ration in both periods and expressed a minor weight gain in start period and a minor intake conversion in both periods. The energy level presented also effect for the parameters of pH and morphometry. The diets with LE presented an decrease ($P < 0,05$) of the pH, of the relative length and

weight of gizzard at 14 days and of the left caeca at 14 and 35 days. But, the addition of enzymes alone and mixed with the probiotic in the LE diets significantly reduce the relative length and weight of left caeca in the 14th days. In conclude the diet with LE reducing the growth performance and pH of caecas of poultry and increase the morphometric parameters. But, the addition enzymes alone and mixed with probiotic in the LE diets are able to reduce the length and weight of left caeca in the 14th days.

Keywords: Amylase; growth performance; pH; wheat; xylanase

INTRODUÇÃO

Durante anos os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) melhoradores de crescimento foram utilizados na nutrição animal para prevenir doenças e aumentar o desempenho zootécnico (Barton, 2000). Contudo, a presença de resíduo desses antimicrobianos em tecido animal e no ambiente, assim como a ameaça de resistência de patógenos aos antibióticos utilizados em humanos (Barton, 2000; Van den Bogaard & Stobbering, 2000) levou sua retirada da produção animal em quase todo o mundo. Essa nova realidade tem levado ao desenvolvimento de alternativas e pesquisas para prevenir a ocorrência de doenças e garantir a saúde e o desempenho dos animais. Entre elas, a seleção de animais geneticamente mais resistentes, práticas sanitárias, eliminação de patógenos na água, vacinação e aplicação de aditivos em rações. Dentre os aditivos utilizados nas rações, os probióticos e enzimas têm sido exaustivamente pesquisados (Fuller, 1989; Bertechini & Hosain, 1993; Mountzouris et al., 2007).

Segundo Fuller (1989), o probiótico é um suplemento alimentar

microbiano vivo, capaz de afetar benéficamente o hospedeiro, com capacidade de promover o equilíbrio da população microbiana do TGI, prevenindo doenças no trato digestório. Além disso, melhora a digestibilidade das rações (Apata, 2008; Li et al., 2008), levando à maior utilização dos nutrientes, o que resulta em melhor desempenho zootécnico dos animais (Kabir et al., 2004; 2005; Mountzouris et al., 2007; 2010). Mountzouris et al. (2007; 2009) demonstraram que o probiótico além de efetivo no desempenho de frangos de corte, também é capaz de regular a população de bactérias cecais, reduzindo o nível de *Salmonella enteritidis*, quando os animais por ela são desafiados.

Segundo Penz Jr. (1998), as enzimas alimentares suplementam a produção de enzimas endógenas do animal. Atuam principalmente provocando a ruptura das paredes celulares das fibras, sobretudo os polissacarídeos não amiláceos solúveis, aumentando a digestibilidade e a eficiência dos alimentos. Os PNAs têm elevada capacidade de ligar-se a grandes quantidades de água, resultando no aumento da viscosidade do conteúdo intestinal, diminuindo a velocidade do fluxo de passagem dos alimentos ao longo do trato digestório, dificultando a ação das enzimas endógenas. Isso reflete na diminuição da absorção dos nutrientes e o desempenho dos animais (Choct and Annison, 1992; Almirall et al., 1995; Choct et al., 1995). Para compensar parcialmente os efeitos antinutricionais, as aves alimentadas com dietas com elevada quantidade de PNAs podem sofrer adaptações fisiológicas, como o aumento do comprimento e peso do trato digestório (Brenes et al., 1993). Esse é um mecanismo utilizado pela ave para aumentar a digestão e a absorção dos nutrientes e melhorar o desempenho (Brenes et al., 1993; Steinfeldt et al., 1998; Wang et al., 2005; Gao et al., 2008; García et al., 2008; Biggs & Parsons,

2009). Porém, nesse caso, quase sempre o aumento do trato digestório é resultado do desvio de nutrientes que seriam utilizados para o crescimento do animal, resultando no processo final de produção em baixo rendimento de carcaça (Yasar & Forbes, 1997; Danicke et al. 2000).

De acordo com Wyatt & Bedford (1998), a inclusão das enzimas na dieta pode levar em conta a formulação padrão sem alterar os níveis nutricionais, ou alterar a formulação da dieta por meio da redução dos nutrientes. No segundo caso, a adição de enzimas é utilizada para restaurar o valor nutricional reduzido, visando o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais recomendado. Neste contexto, desenvolveu-se o presente trabalho para avaliar o efeito de probiótico e enzimas em dietas com dois níveis de energia. Para isso, analisou-se o desempenho, a morfometria e o pH do trato gastrointestinal de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido com frangos machos da linhagem Ross. No primeiro dia de idade, os animais foram pesados e alojados num total de 12 aves por gaiola. A temperatura ambiental e a umidade relativa do ar foram controladas e registradas diariamente. O abastecimento dos comedouros com ração foi feito através de conchas específicas para cada tratamento, tomando-se o devido cuidado para que os micro-organismos de um tratamento não contaminassem o outro e, este mesmo procedimento foi adotado com o material de limpeza necessário para a lavagem dos bebedouros. Os animais receberam durante todo o período experimental água clorada e ração à vontade. As dietas experimentais foram constituídas de duas formulações, uma com nível padrão

de energia, à base de milho e farelo de soja, e outra com nível baixo de energia (redução de 100 kcal/kg de EM em relação à dieta padrão, obtida pela inclusão de farelo de trigo) (Tab.1). Exceto pelo nível de energia, as dietas apresentaram balanceamento e equivalência nos níveis dos demais nutrientes, atendendo às exigências nutricionais da espécie, de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2005). Cada nível de energia recebeu quatro tratamentos: 1- Controle (sem aditivo); 2- enzimas (xilanase + amilase + β -glucanase); 3- probiótico (*Enterococcus faecium*) e; 4- enzimas mais o probiótico utilizados nos tratamentos 2 e 3 (Tab. 1).

Tabela 1- Composição e níveis nutricionais calculados das dietas experimentais nas fases inicial (1-21 dias) e de crescimento (22-35 dias)

INGREDIENTES (%)	1-21 dias		22-35 dias	
	Nível de Energia			
	Padrão	Baixo	Padrão	Baixo
Milho	58,46	52,38	59,59	53,53
Farelo de soja 46	34,08	32,66	31,94	30,52
Farelo de trigo	-	7,54	-	7,52
Óleo de soja	3,08	3,08	4,38	4,38
Calcáreo	1,36	1,39	1,31	1,35
Fosfato bicálcico	1,72	1,63	1,59	1,50
Sal comum	0,46	0,46	0,46	0,46
Premix Vitamínico	0,04	0,04	0,04	0,04
Premix Mineral	0,08	0,08	0,08	0,08
Lisina	0,29	0,30	0,22	0,23
DL-Metionina	0,27	0,28	0,24	0,24
Aditivos*	0,05	0,05	0,05	0,05
Colina 60	0,06	0,06	0,05	0,05
Monensina 20%	0,05	0,05	0,05	0,05
EM (kcal/kg)	3050	2950	3150	3050
PB	21	21	20	20
FB	3,25	3,75	3,16	3,66
Ca	0,95	0,95	0,90	0,90
Pdisponível	0,45	0,45	0,42	0,42
Sódio	0,20	0,20	0,20	0,20
Lisina Total	1,29	1,29	1,18	1,18
Metionina Total	0,57	0,57	0,53	0,53
Triptofano Total	0,27	0,27	0,26	0,26
Colina (mg/kg)	1500	1500	1400	1400

* Probiótico contituído por *Enterococcus faecium* - 10^{10} UFC/g (Cilactin®): 30g/ton; Mistura de enzima xilanase (Ronozyme WX): 100g/ton e enzimas amilase + β -glucanase (Ronozyme A): 400g/ton.

Foi avaliado o desempenho das aves e calculou-se o ganho de peso (GP), o consumo de ração (CR) e a conversão alimentar (CA) nos períodos de

1 a 21 e de 22 a 35 dias de idade.

Para as medidas de morfometria intestinal, aos 14 e 35 dias, uma ave de cada repetição foi abatida por deslocamento cervical, o intestino delgado foi excisado e de acordo com Wang et al. (2005), a moela, a porção anterior intestinal (duodeno e jejuno), o íleo e o ceco esquerdo foram pesados e os comprimentos medidos. Nestes mesmos dias, os respectivos conteúdos da moela, íleo e cecos foram homogeneizados com água estéril em béquer de 50 mL e de acordo com González-Alvarado et al. (2007) foi medido o pH em cada segmento do trato gastrointestinal.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com o esquema fatorial 2x4 (dois níveis de energia e quatro aditivos) e cada tratamento recebeu 5 repetições de 12 aves no primeiro período e 8 no segundo.

Os dados foram submetidos à análise de variância através do programa estatístico SPSS (2006) e na presença de diferença significativa foi realizada a comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho zooténico

Para os resultados de desempenho observou-se o efeito ($P < 0,05$) da energia nos dois períodos analisados (1 a 21 e 22 a 35 dias idade) (Tab. 2).

Os frangos alimentados com as dietas de baixa energia (com farelo de trigo) consumiram uma maior ($P < 0,05$) quantidade de ração em ambos os períodos e expressaram um menor ($P < 0,05$) GP no período inicial e uma pior

CA nos dois períodos. Esperava-se que os aditivos incluídos nas dietas expressassem algum efeito sobre o desempenho das aves e compensassem a redução original da EM (100 kcal/kg), mais isso não ocorreu. A incorporação de enzimas às dietas para frangos tem resultado em aumentos significativos de desempenho, principalmente em dietas com grãos de trigo (Steenfeldt et al. 1998; Wang et al., 2005; Gao et al., 2008; García et al., 2008; Biggs & Parsons, 2009). Dietas com trigo ou com farelo de trigo geralmente apresentam grandes quantidade de pentosanas que promovem o aumento da viscosidade da digesta (Józefiak et al., 2007) reduzindo a assimilação de nutrientes, por causa da dificuldade de interação entre as enzimas endógenas e seus substratos (Choct & Annison, 1992; Choct et al., 1995; Penz Jr., 1998). O uso de probióticos para frangos de corte tem mostrado, entre outros benefícios, o aumento da produção de ácido láctico (Fuller, 1977) e da disponibilidade de vitaminas e enzimas (Fuller, 1989), que tem reflexos na digestão da dieta com melhores resultados de desempenho (Apata et al., 2008; Mountzouris et al., 2010). Porém, neste trabalho as enzimas e os probióticos (isolados e em combinação) utilizados nas dietas, não trouxeram resultados melhores de desempenho. Corroborando com estes resultados, Gonal et al. (2004), Huang et al. (2004), Li et al. (2008) e Mourão & Pinheiro (2009) também não observaram efeitos no desempenho de frangos, quando xilanases foram adicionadas à dietas com trigo e mistura de micro-organismos à dietas com milho. Alguns autores (Wang et al., 2005; Mountzouris et al., 2010) atribuem a falta de efeito das enzimas e probióticos no desempenho dos animais às suas dosagens na dieta. Neste trabalho, utilizou-se farelo de trigo nas dietas de baixa energia, o qual apresenta quantidade de PNAs superiores ao trigo em grão. Por essa característica, níveis maiores de

enzimas talvez expressassem melhores resultados de desempenho. No meio científico é comum afirmar que a melhor concentração de probiótico na dieta fica em torno de 10^8 a 10^{10} UFC/kg de dieta. No entanto, alguns pesquisadores encontraram melhora de desempenho quando níveis mais baixos de probiótico foram introduzidos à dieta (Apata, 2008; Li et al., 2008). Contudo, a eficiência ou ineficiência do probiótico está relacionada também a outros fatores, tais como composição da espécie microbiana e sua viabilidade, método e frequência de aplicação, idade da ave, higiene das instalações, composição da dieta (tipo de cereal e seu sinergismo ou antagonismo ao micro-organismo utilizado) e fatores de estresse ambiental.

Tabela 2- Desempenho zootécnico de frangos de corte nos períodos de 1 a 21 e 22 a 35 dias de idade

Tratamento	1 a 21 dias			22 a 35 dias		
Energia	GP (g)	CR (g)	CA	GP (g)	CR (g)	CA
Padrão	939,30	1215,95	1,30	1136,09	2096,06	1,85
Baixa	925,52	1237,69	1,35	1133,88	2145,02	1,89
Aditivos						
Controle	929,95	1224,49	1,33	1133,88	2113,37	1,86
Enzima	930,22	1229,54	1,32	1134,63	2117,47	1,87
Probiótico	931,20	1226,82	1,32	1135,65	2129,92	1,88
Enz+Prob	929,22	1226,45	1,32	1135,78	2121,40	1,87
Probabilidades						
Energia (E)	0,040	0,046	0,011	0,832	0,008	<0,001
Aditivo (A)	0,974	0,989	0,987	0,999	0,920	0,754
E x A	0,982	0,897	0,944	0,996	0,969	0,967
CV(%)	2,63	3,11	4,55	2,65	2,62	1,78

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Energia padrão: 3050 (11-14 dias) e 3150 (32-35 dias) kcal/kg e Energia baixa: 2950 (11-14 dias) e 3050 (32-35 dias) kcal/kg; Enzima (Enz): amilase e xilanase + β -glutanasase. Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium*; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CV: Coeficiente de variação.

Morfometria do TGI

Comparando-se os resultados de morfometria aos 14 e 35 dias de idade, percebe-se uma diminuição no peso e comprimento relativo dos órgãos intestinais com o aumento da idade (Tab. 3 e 4). Isso se deve ao maior crescimento corporal dos frangos em relação ao crescimento de seus órgãos. Resultados semelhantes foram observados previamente em outros experimentos (Nitsan et al., 1991; Palo et al., 1995; Ravindram et al., 2006; Gabriel et al., 2008; Jimenez-Moreno et al., 2009).

Constatou-se nas dietas com baixa energia (farelo de trigo) um aumento significativo no comprimento e peso relativo dos órgãos analisados

aos 14 (moela, e ceco), e aos 35 dias (ceco) em relação às demais dietas (Tab. 3 e 4). Outros investigadores observaram alterações semelhantes no desenvolvimento do trato digestório quando utilizaram dietas com cevada ou trigo (Brenes et al., 1993; Svihus et al., 1997; Mourão e Pinheiro, 2009) ou com concentrações elevadas de PNA solúveis (Langhout et al., 1999).

A adaptação do trato digestório das aves ao consumo de dietas com teores elevados em PNAs pode contribuir para a redução dos efeitos antinutricionais (Marquardt et al., 1994). O aumento no desenvolvimento do TGI observado neste experimento pode ter permitido o aumento do tempo de permanência da dieta no trato digestivo, facilitando sua digestão e o aumento da superfície absorptiva para os nutrientes (Yasar & Forbes, 1997; Jiménez-Moreno et al., 2009).

Avaliando-se o efeito dos aditivos aos 14 e 35 dias de idade, observou-se o efeito das enzimas sozinhas e em combinação com o probiótico, somente nas dietas de baixa energia (com farelo de trigo) aos 14 dias, conforme demonstrado pela interação significativa (Tab. 3 e 4). Nestas dietas, os grupos controle, probiótico, enzima e enzima mais probiótico apresentaram um comprimento relativo do ceco de 20,91; 19,04; 21,13 e 20,07, respectivamente e um peso relativo de 2,46; 2,07; 2,52; 2,07, respectivamente. As enzimas isoladas e em combinação com o probiótico promoveram uma redução no comprimento relativo do ceco de aproximadamente 7% e no peso relativo de aproximadamente 20% em relação aos demais tratamentos. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Wang et al. (2005) e Józefiak et al. (2007) que verificaram decréscimo nos órgãos digestórios quando adicionaram xilanases às dietas com trigo ou com arroz. Em geral, a

adição de enzimas é mais eficiente na fase inicial de desenvolvimento do frango. Nesta fase há um crescente aumento na diversidade e quantidade de enzimas endógenas, assim como no aumento de secreções do trato gastrointestinal, mas esse aumento ainda não é suficiente para a digestão eficiente de algumas dietas (Iji et al., 2001; Gabriel et al., 2008). Já na fase adulta, mesmo não havendo a produção de algumas enzimas como a xilanase, por exemplo, a produção de enzimas endógenas, assim como de secreções gástricas, pancreáticas e biliares, aliadas ao completo desenvolvimento do TGI supre as necessidades do animal para a digestão e absorção de nutrientes, resultando muitas vezes na ineficiência das enzimas exógenas (Noy & Sklan, 1995; Steinfeldt et al., 1998; Batal e Parsons, 2002; Zhou et al., 2009).

Tabela 3- Comprimento relativo (cm/kg de peso vivo) dos segmentos do TGI de frangos de corte aos 14 e 35 dias de idade

Tratamento	14 dias			35 dias		
	Íleo	IA	Ceco	Íleo	IA	Ceco
Energia						
Padrão	156,78	109,68	19,02	39,71	34,08	5,76
Baixo	156,39	110,06	20,07	40,28	34,10	5,98
Aditivos						
Controle	157,24	110,40	20,00	40,68	34,13	5,92
Enzima	155,79	109,20	18,99	39,63	34,17	5,82
Probiótico	157,42	110,14	20,07	40,26	34,16	5,95
Enz+Prob	155,90	109,74	19,13	39,41	33,91	5,80
Probabilidades						
Energia (E)	0,810	0,828	0,001	0,192	0,939	0,005
Aditivo (A)	0,835	0,966	0,014	0,153	0,902	0,420
E x A	0,995	0,992	0,021	0,971	0,686	0,857
CV(%)	2,98	4,57	6,04	3,38	2,41	4,26

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); IA (Intestino anterior): duodeno e jejuno; Energia padrão: 3050 (11-14 dias) e 3150 (32-35 dias) kcal/kg e Energia baixa: 2950 (11-14 dias) e 3050 (32-35 dias) kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase e xilanase + β -glutanasase; Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium*; CV: Coeficiente de variação.

Tabela 4- Peso relativo (g/kg de peso vivo) dos segmentos do TGI de frangos de corte aos 14 e 35 dias de idade

Tratamento	14 dias				35 dias			
	Moela	IA	Íleo	Ceco	Moela	IA	Íleo	Ceco
Padrão	15,66	29,68	13,01	2,08	6,62	11,28	6,24	1,31
Baixo	16,85	29,66	13,02	2,28	6,70	11,24	6,23	1,38
Aditivos								
Controle	16,42	29,62	13,07	2,25	6,63	11,25	6,24	1,34
Enzima	16,12	29,70	12,98	2,07	6,70	11,31	6,23	1,35
Probiótico	16,25	29,62	13,04	2,31	6,64	11,18	6,21	1,35
Enz+Prob	16,24	29,74	12,96	2,08	6,66	11,29	6,25	1,34
Probabilidades								
Energia (E)	<0,001	0,977	0,969	0,002	0,169	0,781	0,928	0,001
Aditivo (A)	0,749	0,995	0,977	0,016	0,865	0,921	0,997	0,995
E x A	0,992	0,969	0,981	0,007	0,620	0,737	0,975	0,617
CV(%)	5,04	3,77	4,30	11,47	2,70	3,73	5,78	4,37

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); IA (Intestino anterior): duodeno e jejuno; Energia padrão: 3050 (11-14 dias) e 3150 (32-35 dias) kcal/kg e Energia baixa: 2950 (11-14 dias) e 3050 (32-35 dias) kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase e xilanase + β -glutanasase. Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium*; CV: Coeficiente de variação.

pH da digesta do TGI

Comparando as dietas de baixa energia (com farelo de trigo) com energia padrão (sem farelo de trigo), aos 14 e 35 dias de idade, constatou-se uma diminuição significativa nos valores de pH no conteúdo da moela e ceco, para as dietas com baixa energia, aos 14 dias (Tab. 5). A diminuição do pH da digesta pode ser consequência do maior conteúdo de fibra solúvel presente nas dietas (Jiménez-Moreno, 2007). Partículas de mais difícil digestão ficam retidas por mais tempo dentro da moela, estimulando sua atividade (Hetland et al., 2005; Jiménez-Moreno, 2007). Duke (1986) observou que a presença de alimento na moela induz ao aumento da produção de ácido clorídrico pelo proventrículo, baixando o pH da moela. A diminuição do pH pode melhorar a

atividade da pepsina, a retenção de nitrogênio e a solubilidade da fração mineral do alimento (Guinotte et al., 1995). Além disso, a redução do pH da moela pode promover um efeito preventivo ao desenvolvimento de patógenos, como *Salmonella* sp e *Clostridium. perfringens* (Engberg et al., 2004; Bjerrum et al., 2005). Nos cecos a fração solúvel da fibra que não é digerida e nem absorvida até a porção final do intestino, pode baixar o pH da digesta cecal pela atividade fermentativa da população microbiana residente. O produto da fermentação, ácidos orgânicos e gases (Józefiak et al., 2004a,b), contribuem para diminuir o pH cecal e muitas vezes podem melhorar os resultados de desempenho.

Os valores de pH da digesta nos diferentes segmentos do TGI também aumentaram com a idade (Tab 5), concordando com os resultados encontrados por outros pesquisadores (González-Alvarado et al., 2007; Jiménez-Moreno et al., 2009). Segundo Jiménez-Moreno et al. (2009) o diâmetro do orifício de saída da moela para o duodeno é menor aos 5 do que aos 15 dias de idade, e conseqüentemente, a porcentagem de partículas maiores retida na moela será reduzida com a idade, aumentando o pH. O aumento do pH também pode ser afetado pelo aumento da produção de enzimas digestivas que cresce no frango até a idade de 35 dias (Iji et al., 2001; Gabriel et al., 2008). As enzimas são responsáveis por degradar moléculas complexas de polissacarídeos (Choct et al., 1999; Mathlouthi et al., 2003) e quando sua atuação é eficiente há uma diminuição do conteúdo cecal e da fermentação microbiana, implicando na redução da produção de ácidos graxos voláteis, o que geralmente eleva os valores de pH (Stanoganois & Pearce, 1985).

Contudo, no presente trabalho a adição de enzimas e probióticos isolados e em combinação não promoveu a redução dos valores de pH em nenhum dos segmentos analisados (tab. 5).

Tabela 5- pH de segmentos do TGI de frangos de corte aos 14 e 35 dias de idade

Tratamento	14 dias			35 dias		
Energia	Moela	Íleo	Ceco	Moela	Íleo	Ceco
Padrão	3,74	6,80	6,09	3,79	7,02	6,23
Baixo	3,28	6,81	5,88	3,80	7,03	6,24
Aditivos						
Controle	3,50	6,80	5,96	3,78	7,04	6,27
Enzima	3,52	6,81	5,98	3,81	7,02	6,25
Probiótico	3,51	6,79	5,99	3,83	7,01	6,20
Enz+Prob	3,52	6,82	6,00	3,79	7,04	6,24
Probabilidades						
Energia (E)	<0,001	0,679	<0,001	0,699	0,909	0,633
Aditivo (A)	0,866	0,463	0,763	0,135	0,605	0,359
E x A	0,675	0,795	0,700	0,956	0,858	0,966
CV(%)	6,84	6,90	2,34	1,32	0,85	1,28

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Energia padrão: 3050 (11-14 dias) e 3150 (32-35 dias) kcal/kg e Energia baixa: 2950 (11-14 dias) e 3050 (32-35 dias) kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase e xilanase + β -glutanasase; Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium*; CV: Coeficiente de variação.

CONCLUSÃO

Comparando os dois níveis de energia das dietas conclui-se que as dietas com baixo nível de energia reduzem o desempenho de frangos de corte e aumentam ($P < 0,05$) o pH, o comprimento e o peso de seguimentos do TGI.

Os aditivos utilizados não alteram os parâmetros de desempenho e pH. No entanto, a adição das enzimas isoladas e em combinação com o probiótico, nas dietas com baixa energia (com farelo de trigo), diminui

significativamente o comprimento e o peso do ceco aos 14 dias.

BIBLIOGRAFIA

- ALMIRALL, M.; FRANCESCH, M.; PÉREZ-VENDRELL, A. M.; BRUFAU, J.; ESTEVE-GARCIA, E. The differences in intestinal viscosity produced by barley and β -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in chicks. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v.125, p.947–955, 1995.
- APATA, D. F. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Amsterdam, v.88, p.1253-1258, 2008.
- BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.13, p.279–299, 2000.
- BATAL, A. B.; PARSONS, C. M. Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. **Poultry Science**, Champaign, v.81, p.400-407, 2002.
- BERTECHINI, A. G.; HOSSAIN, S. M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 1993 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Campinas. **Anais...** Campinas:Facta, 1993. p. 1.
- BIGGS, P.; PARSONS, C. M. The effects of whole grains on nutrient digestibilities, growth performance, and cecal short-chain fatty acid concentrations in young chicks fed ground corn-soybean meal diets. **Poultry Science**, Champaign, v.88, p.1893–1905, 2009.
- BJERRUM, L.; PEDERSEN, K.; ENGBERG, R. M. The influence of whole wheat

- feeding on salmonella infection and gut flora composition in broiler. **Avian Disease**, Jacksonville, v.49, p.9–15, 2005.
- BRENES, A.; SMITH, M.; GUENTER, W.; MARQUARDT, R. R. Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat- and barley -based diets. **Poultry Science**, Champaign, v.72, p.1731–1739, 1993.
- CHOCT, M.; ANNISON, G. Antinutritive effect of wheat pentosans in broiler chicken: Role of viscosity and gut microflora. **British Poultry Science**, Cambridge, v.33, p.821–834, 1992.
- CHOCT, M.; HUGES, R. J.; TRIMBLE, R. P.; ANGKANAPORN, K.; ANNISON, G. Non-starch polysaccharide-degrading enzymes increase the performance of broiler chickens fed wheat and low apparent metabolisable energy. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v.125, p.485–492, 1995.
- CHOCT, M.; HUGHES, R. J.; BEDFORD, M. R. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and cecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. **British Poultry Science**, Cambridge, v.40, p.419–422, 1999.
- DANICKE, S.; JEROCH, H.; BOTTCHE, W.; SIMON, O. Interactions between dietary fat type and enzyme supplementation in broiler diets with high pentosan contents: effects on precaecal and total tract digestibility of fatty acids, metabolizability of gross energy, digesta viscosity and weights of small intestine. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.84, p.279-294, 2000.
- DUKE, G. E. Alimentary canal: Secretions and digestion, special digestion functions and absorption. in **Avian Physiology**. P. D. Sturkie, ed. Springer-

Verlag, New York, NY. p.289–302,1986.

ENGBERG, R. M.; HEDEMANN, M. S.; STEENFELDT, S.; JENSEN, B. B.

Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. **Poultry Science**, Champagne, v.83, p.925–938, 2004.

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

FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. **British Poultry Science**, Cambridge, v.18, p.85-94, 1977.

GABRIEL,I.; MALLET, S.; LCONTE, M.; TRAVEL, A.; LALLES, J.P. Effects of whole wheat feeding on the development of the digestive tract of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.142, p.144-162, 2008.

GAO, F.; JIANG, Y.; ZHOU, G. H.; HAN, Z. K. The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.142, p.173–184, 2008.

GARCIA, M.; LAZARO, R.; LATORRE, M. A.; GRACIA, M. I.; MATEOS, G. G. Influence of enzyme supplementation and heat processing of barley on digestive traits and productive performance of broilers. **Poultry Science**, Champaing, v.87, p.940–948, 2008.

GONAL, M.; YASAR, S.; FORBES, J. M. Performance and some digesta parameters of broiler chickens given low or high viscosity wheat-based diets

- with or without enzyme supplementation. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, Kavaklıdere, v.28, p.323-327, 2004.
- GONZALEZ-ALVARADO, J. M.; JIMENEZ-MORENO, E.; LAZARO, R.; MATEOS, G. G. Effects of cereal, heat processing of the cereal, and fiber on productive performance and digestive traits of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.86, p.1705–1715, 2007.
- GUINOTTE, F.; GAUTRON, J.; NYS, Y. Calcium solubilization and retention in the gastrointestinal tract in chicks (*Gallus domesticus*) as a function of gastric acid secretion inhibition and of calcium carbonate particle size. **British Journal Nutrition**, Cambridge, v.73, p.125–139, 1995.
- HETLAND, H.; SVIHUS, B.; CHOCT, M. Role of insoluble fiber on gizzard activity in layers. **Australian Journal Agriculture Research**, Collingwood, v.14, p.38-46, 2005.
- HUANG, M. K.; CHOI, J. L.; HOUDE, R.; LEE, J. W.; LEE, B.; ZHAO, X. Effects of lactobacilli and an acidophilic fungus on the production in Nigeria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.20, p.51–56, 2004.
- IJI, P. A.; SAKI, A. A.; TIVEY, D. R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2: Development and characteristics of intestinal enzymes. **British Poultry Science**, Cambridge, v.42, p.514–522, 2001.
- JIMENEZ-MORENO, E.; GONZALEZ-ALVARADO, J. M.; DE COCA-SINOVA, A.; LAZARO, R.; MATEOS, G. G. Effects of source of fibre on the development and pH of the gastrointestinal tract of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.154, p.93–101, 2009.
- JIMENEZ-MORENO, E.; GONZALEZ-ALVARADO, J. M.; GONZALEZ-

- SERRANO, A.; LAZARO, R.; MATEOS, G. G. Effects of inclusion of several fiber sources on digesta pH of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.86, p640(S), 2007.
- JÓZEFIAK, D.; RUTKOWSKI, A.; FRĄTCZAK, M.; BOROS, D. The effect of dietary fibre fractions from different cereals and microbial enzymes supplementation on performance ileal viscosity and short-chain fatty acids concentration in caeca of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.13, p.487–496, 2004a.
- JÓZEFIAK, D.; RUTKOWSKI, A.; MARTIN, S.A. Carbohydrate fermentation in the avian caeca - a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.113, p.1–15, 2004b.
- JÓZEFIAK, D.; RUTKOWSKI, A.; JENSE, B. B.; ENGBERG, R. M. Effects of dietary inclusion of triticale, rye and wheat and xylanase supplementation on growth performance of broiler chickens and fermentation in the gastrointestinal tract. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.132, p.79–93, 2007.
- LANGHOUT, D. J.; SCHUTTE, J. B.; VAN LEEUWEN, P.; WIEBENGA, J.; TAMMINGA, S. Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. **British Poultry Science**, Cambridge, v.40, p.340–347, 1999.
- LI, L. L.; HOU, Z. P.; LI, T. J.; WU, G. Y.; HUANG, R. L.; TANG, Z. R.; YANG, C. B.; GONG, J.; YU, H.; KONG, X. F. Effects of dietary probiotic supplementation on ileal digestibility of nutrients and growth performance in 1- to 42-day-old broilers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,

Amsterdam, v.88, p.35–42, 2008.

MARQUARDT, R. R.; BOROS, D.; GUENTER, W.; CROW, G. The nutritive value of barley, rye, wheat and corn for young chicks as affected by use of a *Trichoderma reesei* enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.45, p.363-378, 1994.

MATHLOUTHI, N.; JUIN, H.; LARBIER, M. Effect of xylanase and β -glucanase supplementation of wheat- or wheat- and barley-based diets on the performance of male turkeys. **British Poultry Science**, Cambridge, v.44, p.291–298, 2003.

MOUNTZOURIS, K. C.; BALASKAS, C.; XANTHAKOS, I.; TZIVINIKOU, A.; FEGEROS, K. Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. **British Poultry Science**, Cambridge, v.50, p.467–478, 2009.

MOUNTZOURIS, K. C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities. **Poultry Science**, Champaign, v.86, p.309–317, 2007.

MOUNTZOURIS, K. C.; TSITRSIKOS, P.; PALAMIDI, I.; ARVANITI, A.; MOHNL, M.; SCHATZMAYAR, G.; FEGEROS, K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. **Poultry Science**, Champaign, v.89, p.58-67, 2010.

MOURÃO, J. L. T. A. M.; PINHEIRO, V. M. C. Efeitos do centeio, do trigo e da

- suplementação com xilanases sobre o valor nutricional de dietas e o desempenho de frangos corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n.12, p.2417-2424, 2009.
- NITSAN, Z.; BEN-AVRAHAM, G; ZOREF, Z.; NIR, I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, Cambridge, v.32, p.515–523, 1991.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.74, p.366–373, 1995.
- PALO, P. E.; SELL, J. L.; PIQUER, F. J.; VILASECA, L.; SOTO-SALANOVA, M. F. Effects of nutrient restriction on broiler chickens. 2: Performance and digestive enzyme activities. **Poultry Science**, Champaign, v.74, p.1470–1483, 1995.
- PENZ JÚNIOR, A. M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Botucatu-SP, v.35, p.165-178, 1998.
- RAVINDRAN, V.; WU, Y. B.; THOMAS, D. G.; MOREL, P.C.H. Influence of whole wheat feeding on the development of gastrointestinal tract and performance of broiler chickens. **Australian Journal Agriculture Research**, Collingwood, v.57, p.21–26, 2006.
- 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. **Tabelas brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2ª edição-Viçosa: UFV. Departamento de Zootecnia, 2005. 186 p.
- STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES (SPSS). Version 15.0.

[Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

- STANOANOIS, G.; PEARCE, G. R. The digestion of fibre by pigs. 1. The effect of amount and type of fibre on apparent digestibility, nitrogen balance and rate of passage. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.53, p.513–530, 1985.
- STEENFELDT, S.; HAMMERSHÙJ, M.; MUÈ LLERTZ, A.; JENSEN, F.J. Enzyme supplementation to wheat-based diets for broilers. 2. Effects on growth performance and intestinal viscosity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.75, p.45-65, 1998.
- SVIHUS, B.; HERSTAD, O.; NEWMAN, C. W.; NEWMAN, R. K. Comparison of performance and intestinal characteristics of broiler chickens fed on diets containing whole, rolled or ground barley. **British Poultry Science**, Cambridge, v.38, p.524–529, 1997.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, v.14, p.327–335, 2000.
- WANG, Z. R.; QIAO, S. Y.; LU, W. Q.; LI, D. F. Effects of supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, Campaing, v.84, p.875-881, 2005.
- WYATT, C. L.; BEDFORD, M. R. Uso de enzimas nutricionais para maximizar a utilização de nutrientes pelo frango de corte em dietas á base de milho: recentes progressos no desenvolvimento e aplicação prática. In: Seminário Técnico FINNFEEDS, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FINNFEEDS, 1998, p.2-12.

YASAR, S.; FORBES, J. M. Effects of wetting and enzyme supplementation of wheat-based foods on performance and gut responses of broiler chickens.

British Poultry Science, Cambridge, v.38, p43-44(S), 1997.

ZHOU, Y.; JIANG, Z.; LV, D.; WANG, T. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels.

Poultry Science, Champaign, v.88, p.316-322, 2009.

CAPÍTULO IV

Probiótico e enzimas na alimentação de frangos de corte: efeitos na metabolizabilidade das dietas e produção de resíduos

Probiotic and enzymes in the food of broilers: effects in digestibility of diets and waste production

I. I. Santos, A. M. Kessler, J. F. Mendes, R. V. Kras, M. Gianfelici

RESUMO

Neste trabalho foram utilizados frangos machos Ross para avaliar o efeito de probiótico e enzimas em dietas com dois níveis de energia, nos períodos de 11 a 14 e 32 a 35 dias de idade. A dieta com o nível padrão de energia foi baseada em milho e farelo de soja e a dieta com baixa energia (BE) com milho e farelos de soja e trigo. Cada nível de energia recebeu quatro tratamentos: Sem aditivo; enzimas xilanase, amilase e β -glucanase; probiótico *Enterococcus faecium* e; enzimas mais probiótico utilizados nos tratamentos anteriores. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e cada tratamento teve 5 repetições de 12 aves no primeiro período e de 8 no segundo. Calculou-se o efeito dos aditivos sob a metabolizabilidade e digestibilidade de nutrientes e a EMA. Também foi calculada a produção de dejetos (PD), a excreção de água (EA), nitrogênio (EN) e coeficiente de resíduo (CRe). Houve efeito ($P < 0,001$) da energia para os parâmetros de metabolizabilidade e digestibilidade em ambos os períodos e efeito das enzimas isoladas e em combinação com probiótico, nas dietas de BE, no primeiro período. No período de 32 a 35 dias, obteve-se os mesmos efeitos para os métodos de coleta total e

ileal, porém com exceção da proteína bruta os valores do método de coleta total foram significativamente maiores para todos os parâmetros analisados. A PD, EA, EN e o CRe foram maiores ($P < 0,005$) nas dietas com BE em ambos os períodos. Porém, a adição das enzimas sozinhas e em combinação com probiótico, nas dietas com BE baixou significativamente a PD na MS, o CRe e a EN, no período de 11 a 14 dias. Conclui-se que, a adição das enzimas isoladas ou em combinação com probiótico para as dietas com baixa energia é mais eficiente e necessária do que para aquelas com nível de energia padrão, aumentando a digestibilidade e diminuindo a excreção de resíduos.

Palavras chave: Amilase; dejetos; nitrogênio; trigo; xilanase

ABSTRACT

This study used Ross male broiler chickens to evaluate the effect of probiotic and enzymes in diets with two energy levels from 11 to 14 and from 32 to 35 days-old. The (LE) low energy diet was based on corn, soybean meal and wheat bran and the standard diet with corn and soybean meal. Each energy level received four treatments: Without additive; xylanase, amylase and β -glucanase enzymes; *Enterococcus faecium* probiotic and; enzymes plus probiotic used in the other treatments. The experimental design was completely randomized with 5 repetitions of 12 birds in the first period and 8 birds in the second period to each treatments. The effect of EMA and metabolization and digestibility of nutrients was calculated. In addition the (SP) sludge, (WE) water and (NE) nitrogen excretion and (RC) residue coefficient too were calculated. There was an effect ($P < 0,001$) of energy level to all the metabolization and digestibility parameters in both periods and in the first period there was an effect

of enzyme isolate and in combination with probiotic in the LE diets. The total and ileal collection method obtained the same effects in the period of 32 to 35 days. But, the values of total collection method were significantly bigger for every parameter analyzed with exception of gross protein. The SP, WE, NE and the RC were bigger ($P < 0,005$) in the diets with LE level in both periods. But, at 11 to 14 days the addition of enzymes alone and in combination with probiotic in the LE diets reduced significantly the SP to MS, the RC and NE. In conclusion, the addition of the enzymes alone or mix with the probiotic is more efficient and necessary for the low energy than standard energy diets. Thus they improve the digestibility of LE diets and reduce waste production.

Keywords: Nitrogen; sludge; wheat; amylase, xylanase

INTRODUÇÃO

Na criação de aves no Brasil, o milho é o principal alimento energético utilizado nas formulações de dietas. Entretanto, devido a oscilações no preço, especialmente na entressafra, e sua utilização para produção de etanol, a busca pela substituição total ou parcial do milho nas dietas, tem ganhado atenção dos pesquisadores brasileiros.

Um dos cereais bastante pesquisado é o trigo, que na Europa é o principal ingrediente da dieta de aves. O trigo é um alimento de grande valor nutricional, porém apresenta em sua composição uma gama de fatores antinutricionais, entre eles os polissacarídeos não amiláceos solúveis (PNAs) que interferem na digestibilidade dos nutrientes. No trigo, o principal componente dos PNAs é o arabinoxilano, representando 50-80 g/kg de matéria seca (Annison, 1990). Choct & Annison (1992), monitorando níveis de

arabinoxilanos nas dietas com trigo, constataram resultados significativamente menores da energia metabolizável aparente nas dietas cujas quantidades de arabinoxilanos eram maiores. O farelo de trigo é o subproduto da produção da farinha de trigo e representa em torno de 25% do grão inteiro. No farelo os compostos fibrosos estão em maior concentração, o que pode acarretar, dependendo do nível de inclusão, baixa digestibilidade em dietas de não ruminantes.

Dietas com baixa digestibilidade podem afetar o desempenho das aves, especialmente no período inicial (Campbell & Bedford, 1992) e aumentar a excreção de resíduos poluentes.

A baixa digestibilidade dos PNAs se deve a sua capacidade de ligar-se a moléculas de água e promoverem a hidratação da digesta, que pode dificultar fisicamente os processos de digestão e absorção dos nutrientes e a atuação das enzimas digestivas (Penz Jr., 1998), favorecendo o aumento na quantidade de excreta produzida e interferindo na qualidade da cama onde os animais estão alojados.

Dos resíduos produzidos pela criação animal, o nitrogênio está entre os principais componentes poluentes (Kurvits & Martab, 1998). O principal problema do nitrogênio no solo é sua transformação em nitrato, uma forma que se torna facilmente solúvel, sendo lixiviado para lençóis freáticos, contaminando água e solo (Vitousek et al., 1997).

Para melhorar a digestibilidade dos nutrientes, muitos pesquisadores têm utilizado probióticos e enzimas na alimentação animal. Tournut (1998), Apata et al. (2008) e Mountzouris et al. (2010) apresentaram dados em que probióticos administrados através da dieta, elevaram os valores de energia

metabolizável da ração e melhoraram a digestibilidade da gordura e proteína para frangos de corte. Almirall et al. (1995) e Steenfeldt et al. (1998a,b) verificaram que, a introdução de enzimas às dietas diminuiu a viscosidade da digesta, melhorou a digestão, a absorção dos nutrientes (Jiménez-Moreno et al., 2009) e reduziu a excreção de água (Garcia et al. (2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de probiótico e enzimas em dietas com e sem farelo de trigo, sob dois níveis de energia, nos períodos de 11 a 14 e 32 a 35 dias de vida de frangos de corte. Calculou-se o efeito sob a digestibilidade de nutrientes e a EMA e sob o coeficiente de resíduo, a produção de dejetos, a excreção de água e nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tendo a fase de campo e o abate dos animais realizados nas dependências do setor de avicultura do Laboratório de Ensino Zootécnico e, as análises laboratoriais no Laboratório de Nutrição Animal.

O experimento foi conduzido com frangos machos da linhagem Ross a partir do primeiro dia de idade. Os animais foram pesados e alojados em gaiolas, admitindo-se uma variabilidade de $\pm 5\%$ entre as médias dos pesos para cada gaiola. A temperatura ambiental e a umidade relativa do ar foram controladas e registradas diariamente. O abastecimento dos comedouros com ração foi feito através de conchas específicas para cada tratamento, tomando-se o devido cuidado para que os micro-organismos de um tratamento não contaminassem o outro e este mesmo procedimento foi adotado com o material de limpeza necessário para a lavagem dos bebedouros. Os animais receberam

durante todo o período experimental água clorada e ração à vontade.

As dietas experimentais foram constituídas de duas formulações, uma com nível padrão de energia, à base de milho e farelo de soja, e outra com nível baixo de energia (redução de 100 kcal/kg de EM em relação à dieta padrão, obtido pela inclusão de farelo de trigo) (Tab.1). Exceto pelo nível de energia, as dietas apresentaram balanceamento e equivalência nos níveis dos demais nutrientes, atendendo às exigências nutricionais da espécie, de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2005). Cada nível de energia recebeu quatro tratamentos: 1- Controle (sem aditivo); 2- enzimas (xilanase, amilase e β -glucanase); 3- probiótico (*Enterococcus faecium*) e; 4- enzimas mais o probiótico utilizados nos tratamentos 2 e 3 (Tab. 1).

Tabela 1- Composição e níveis nutricionais calculados para as dietas experimentais nas fases inicial (1-21 dias) e de crescimento (22-35 dias)

INGREDIENTES (%)	1-21 dias		22-35 dias	
	Nível de Energia			
	Padrão	Baixo	Padrão	Baixo
Milho	58,46	52,38	59,59	53,53
Farelo de soja 46	34,08	32,66	31,94	30,52
Farelo de trigo	-	7,54	-	7,52
Óleo de soja	3,08	3,08	4,38	4,38
Calcáreo	1,36	1,39	1,31	1,35
Fosfato bicálcico	1,72	1,63	1,59	1,50
Sal comum	0,46	0,46	0,46	0,46
Premix Vitamínico	0,04	0,04	0,04	0,04
Premix Mineral	0,08	0,08	0,08	0,08
Lisina	0,29	0,30	0,22	0,23
DL-Metionina	0,27	0,28	0,24	0,24
Aditivos*	0,05	0,05	0,05	0,05
Colina 60	0,060	0,06	0,05	0,05
Monensina 20%	0,05	0,05	0,05	0,05
EM (kcal/kg)	3050	2950	3150	3050
PB	21	21	20	20
FB	3,25	3,75	3,16	3,66
Ca	0,95	0,95	0,90	0,90
Pdisponível	0,45	0,45	0,42	0,42
Sódio	0,20	0,20	0,20	0,20
Lisina Total	1,29	1,29	1,18	1,18
Metionina Total	0,57	0,57	0,53	0,53
Triptofano Total	0,27	0,27	0,26	0,26
Colina (mg/kg)	1500	1500	1400	1400

* Probiótico *Enterococcus faecium* - 10^{10} UFC/g (Cilactin®): 30 g/ton; Mistura de enzima xilanase (Ronozyme® WX): 100 g/ton e amilase + β -glucanase (Ronozyme® A): 400 g/ton.

O período experimental foi constituído por duas etapas: dos 11 aos 14 e dos 32 aos 35 dias de vida das aves.

Para a digestibilidade foi utilizado o método de coleta total das excretas na primeira etapa e na segunda os métodos de coleta total e ileal. Em ambos os métodos foi feita a pesagem das aves, bem como das rações fornecidas no início e final de cada período experimental. A coleta das excretas foi realizada pela manhã e à tarde, com um intervalo de 12 horas. Toda a excreta produzida foi acondicionada em sacos plásticos identificados e conservada em freezer para análises posteriores. O óxido de cromo foi utilizado como indicador externo para determinação da digestibilidade ileal, sendo adicionado às dietas na razão de 0,25%.

A coleta da digesta ileal foi feita logo após ao abate, utilizando-se três aves por repetição. O íleo foi delimitado entre o divertículo de Meckel e a junção íleo-ceco-cólica.

As amostras das excretas, das dietas e do conteúdo íleal foram analisadas quanto aos teores de matéria seca, proteína bruta segundo AOAC (1995) e de energia bruta, segundo Parr (1988). O teor de cromo foi analisado por espectrofotometria, após digestão ácida de acordo com Udén et al. (1980). Foram calculados os coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), da proteína bruta (CMPB), da energia bruta (CMEB) e a energia metabolizável aparente (EMA). Para a digestibilidade ileal, os coeficientes de digestibilidade da MS e PB e a EMA foram calculados por intermédio do fator de indigestibilidade (FI) do cromo (Rodriguez et al., 2005).

Foi determinada a produção de dejetos na matéria natural e matéria seca e a excreção de água e nitrogênio. O coeficiente de resíduo foi calculado

como grama de matéria seca excretada por grama de peso vivo ganho, segundo Laurentis et al. (2007), adaptado para animais em gaiolas.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com o esquema fatorial 2x4 (dois níveis de energia e quatro aditivos) e cada dieta recebeu cinco repetições de 12 aves no primeiro período e de 8 no segundo.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico SPSS (2006) e, na presença de diferença significativa foi realizada a comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de metabolizabilidade e de digestibilidade da MS, PB e EB e a EMA das dietas estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Constatou-se efeito ($P < 0,001$) da energia em ambos os períodos analisados (de 11 a 14 e de 32 a 35 dias). O efeito do nível de energia era esperado em função da dieta com energia padrão ter sido formulada com maior energia metabolizável em ambos os períodos (3050 e 3150 kcal/kg contra 2950 e 3050 kcal/kg), entretanto, a redução esperada na EM, originalmente de 100 kcal/kg, resultou em perdas maiores (206 kcal/kg no primeiro período e 196 kcal/kg no segundo, com base na MS). Zhou et al. (2009) verificaram que os valores no coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), da proteína bruta (CMPB) e a EMA diminuíram com a redução da EM das dietas. Porém, com a introdução de enzimas às dietas, os valores dos CMMS, CMPB e a EMA aumentaram significativamente. Esperava-se, neste trabalho, que a introdução dos aditivos nas dietas com menos EM aumentassem a metabolizabilidade das variáveis analisadas (MS, PB, EB e EMA), atingindo os

níveis semelhantes aos da dieta padrão. Mas, verificou-se que apenas na fase inicial os aditivos enzimas isoladas e em combinação com o probiótico, contidos nas dietas com baixa energia (com farelo de trigo) tiveram um aumento próximo do esperado (Tab. 2). O efeito positivo das enzimas em dietas com trigo e/ou milho é reportado em muitos trabalhos (Wang et al., 2005; Gao et al., 2008; Garcia et al., 2008; Zhou et al., 2009), em alguns deles, esse efeito é mais pronunciado na fase inicial de desenvolvimento dos frangos (0 a 21 dias de idade) (Steenfeldt et al., 1998b; Batal & Parsons, 2002; Zhou et al., 2009). Contudo, o efeito positivo das enzimas também é dependente do tipo de enzima adicionada à dieta, já que existe uma especificidade das enzimas por seus substratos (Penz Jr., 1998); da quantidade de enzima (Zhou et al., 2009) e; do tipo e quantidade do cereal presente nas dietas (Biggs & Parsons, 2009). Dietas com milho apresentam alta digestibilidade e as enzimas exógenas são menos efetivas em dietas com alta digestibilidade (Cowan et al., 1996; Tester et al., 2004; Zhou et al., 2009). Dietas com trigo geralmente são ricas em PNAs, dos quais grande parte são os arabinosilanos com elevada capacidade de se ligar as moléculas de água, causando um aumento na viscosidade da digesta (Choct & Annison, 1992) e dificultando a ação das enzimas endógenas. Nesse caso, a introdução mais adequada de enzima à dieta seria a xilanase. Steenfeldt et al. (1998b) utilizando xilanase em dietas a base de trigo encontraram um aumento significativo na EMAn e na metabolizabilidade da GB e do amido no período inicial. No presente trabalho, o efeito ($P < 0,05$) das enzimas nas dietas com farelo de trigo, no período inicial, resultou em relação às dietas sem enzima, um acréscimo médio para os coeficientes de metabolizabilidade da MS, PB e EB de 2,73%, 3,39% e 2,70% respectivamente, e uma aumento médio da EMA de

80,5 kcal/kg MS (Tab. 2).

Não foi encontrado efeito na EMA e na metabolizabilidade da MS, PB e EB para dietas com probióticos, somente em combinação com as enzimas. Pedroso (2003) constatou que os probióticos utilizados nas dietas de frangos não foram suficientemente competitivos com os demais micro-organismos presentes na população intestinal, sendo incapazes de colonizar o trato digestório. Como as dietas com o probiótico não apresentaram efeitos isoladamente, acredita-se que o efeito obtido na sua combinação com enzimas seja somente efeito das enzimas. Essa ineficiência pode estar relacionada a vários fatores como a composição da espécie microbiana e sua viabilidade, nível de administração, método e frequência de aplicação, idade da ave, higiene das instalações e fatores de estresse ambiental. Além disso, diferentemente da ação das enzimas, o probiótico utilizado não tem efeito direto sobre a metabolizabilidade dos substratos que compõe as variáveis estudadas, e sim um possível efeito indireto associado às atividades promovidas junto a comunidade microbiana do trato digestório.

Comparando os dois períodos percebeu-se que a EMA e a metabolizabilidade da MS, PB e EB foram menores nas aves mais jovens (Tab. 2 e 3). Resultados semelhantes foram obtidos por outros investigadores (Steenfeldt et al., 1998b; Batal & Parsons, 2002; Mourão & Pinheiro, 2009). A menor metabolizabilidade dos nutrientes em frangos jovens está associada à limitação da atividade das enzimas digestivas e das funções do trato gastrointestinal (Nitsan et al., 1991; Noy & Sklan, 1997). Noy & Sklan (1995) constataram que o aumento na metabolizabilidade da proteína em relação ao aumento da idade, se deu devido ao crescimento da atividade das proteases e

da maior eficiência da absorção de aminoácidos pelo desenvolvimento do trato gastrointestinal.

No período de 32 a 35 dias de idade comparou-se os resultados do método de coleta total das excretas com o método de coleta ileal da digesta e constatou-se efeito do método de coleta para a MS, EB e a EMA, obtendo-se valores maiores ($P < 0,001$) com o método de coleta total (Tab. 3). Corroborando com estes resultados, Zanella et al. (1998) avaliando dietas com e sem enzimas constataram que os resultados de EMA das dietas foram maiores quando utilizaram o método de coleta total. O método de coleta ileal permite a dieta ser digerida e absorvida até a porção ileal do intestino, enquanto que pelo método de coleta total o processo de digestão e absorção se estende além do íleo. Logo, a digestibilidade da dieta será maior com o método de coleta total. Por outro lado, a digesta ileal tem normalmente maior presença de proteína de origem endógena, o que por sua vez reduz o coeficiente de digestibilidade aparente (Sakomura & Rostagno, 2007). É normal se obter valores menores de PB com o método de coleta total em aves adultas em relação aos valores obtidos com o método de coleta ileal em aves jovens, porém não se encontrou diferença significativa em relação ao método ileal. Em frangos, fezes e urina são excretadas juntas e esta última é responsável pelo aumento do ácido úrico na excreta, subestimando os cálculos de metabolizabilidade da PB (Wallis & Balnave, 1984; Jorgensen et al., 1996). O ácido úrico pode ser determinado quimicamente (Terpstra & De Haret, 1974), mas nem sempre é possível, por isso, alguns autores consideram o método ileal mais apropriado para a determinação da digestibilidade da PB (Ravindran et al., 1999).

Também foi observado efeito da energia ($P < 0,001$) em ambos os

métodos analisados, refletindo uma diferença do método de coleta total em relação ao ileal para a MS, PB, EB e EMA de 3,3%, 1,78%, 4,38, 76 kcal, respectivamente.

Tabela 2- Coeficiente de metabolizabilidade total da matéria seca (CMMS), proteína bruta (CMPB), energia bruta (CMEB) e EMA em dietas de frangos de corte no período de 11 a 14 dias de idade

	CMMS%			CMPB%			CMEB%			EMA (kcal)		
	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média
	Níveis de energia											
Aditivos	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média
Controle	73,99 ^a	69,78 ^c	71,89	66,85 ^a	64,51 ^b	65,68	77,12 ^a	72,61 ^c	74,86	3262 ^a	3025 ^c	3143
Enzima	74,08 ^a	71,43 ^b	72,75	67,22 ^a	66,34 ^a	66,78	77,03 ^a	74,31 ^b	75,67	3262 ^a	3095 ^b	3178
Probiótico	74,05 ^a	69,75 ^c	71,90	67,27 ^a	63,99 ^b	65,63	77,14 ^a	72,30 ^c	74,72	3267 ^a	3012 ^c	3139
Enz+Prob	74,11 ^a	71,62 ^b	72,86	67,12 ^a	66,52 ^a	66,82	77,23 ^a	74,51 ^b	75,87	3270 ^a	3103 ^b	3187
Média	74,06	70,64		67,11	65,34		77,13	73,43		3265	3059	
Probabilidades												
Energia (E)		<0,001			<0,001			<0,001			<0,001	
Aditivo (A)		<0,001			<0,001			0,001			0,001	
E x A		<0,002			<0,001			0,001			0,001	
CV(%)		2,65			2,05			2,78			3,70	

Médias na mesma coluna e linha seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey (P< 0,05); Energia padrão: 3050 kcal/kg e Energia baixa: 2950 kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase, xilanase e β-glutanase; Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium* (10¹⁰UFC/g); CV: Coeficiente de variação.

Tabela 3- Método de coleta total e ileal para parâmetros de metabolizabilidade e digestibilidade das dietas de frangos de corte dos 32 a 35 dias de idade

Tratamento	Método de coleta (MC)							
	Total	Ileal	Total	Ileal	Total	Ileal	Total	Ileal
Aditivos	MS%		PB%		EMA (kcal)		EB%	
Controle	74,85	74,07	70,82	70,74	3455	3376	78,39	76,56
Enzima	75,05	74,05	71,48	70,71	3451	3377	78,27	76,59
Probiótico	74,88	74,04	70,66	70,71	3443	3376	78,13	76,55
Enz+Prob	74,92	74,07	71,34	70,75	3450	3375	78,24	76,53
Energia								
Padrão	76,85	74,33	72,57	71,34	3548	3436	80,35	78,45
Baixo	73,00	73,78	69,57	70,12	3352	3316	76,17	75,61
Probabilidades								
MC	<0,001		0,132		<0,001		<0,001	
Energia (E)	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
Aditivo (A)	0,939		0,511		0,902		0,907	
MC x E	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
MC x A	0,924		0,529		0,930		0,928	
MC x E x A	0,922		0,514		0,602		0,604	
E x A	0,980		0,298		0,913		0,919	
CV(%)	2,05		2,16		2,74		1,29	

Médias na mesma coluna e linha seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Energia padrão: 3150 kcal/kg e Energia baixa: 3050 kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase, xilanase, β -glucanase. Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium* (10^{10} UFC/g); CV: Coeficiente de variação.

Os resultados dos dejetos produzidos na matéria natural (MN) e matéria seca (MS), assim como a excreção de água e o coeficiente de resíduos são apresentados nas tabelas 4 e 5. Foi encontrado efeito da energia em ambos os períodos analisados (11-14 e 32-35 dias), sendo a produção de dejetos significativamente maior nas dietas com baixa energia em função do aumento na quantidade de fibra oriunda do farelo de trigo. Nestas dietas, no período de 11 a 14 dias, houve também o efeito dos aditivos, onde as enzimas isoladas e em combinação com probiótico reduziram ($P < 0,001$) a produção de dejetos na MS.

A maior produção de dejetos na MN e MS de aves alimentadas com dietas de baixa energia pode estar relacionada com a composição da fibra contida na dieta. A fração solúvel da fibra pode aumentar a quantidade de dejetos produzidos pelos animais (Jorgensen et al., 1996; Garcia et al., 2008). De acordo com Choct & Annison (1992) e Garcia et al. (2008), a fração fibrosa da digesta pode reter grandes quantidades de água e produzir efeitos que prejudicam fisicamente os processos digestivos ocorridos no lúmen intestinal, diminuindo a digestibilidade dos nutrientes aumentando conseqüentemente, a produção dos dejetos.

Houve um aumento significativo da excreção de água, pelos animais que receberam a dieta com baixa energia (contendo farelo de trigo), em ambos os períodos analisados, conseqüência da maior excreção de MN fecal e do maior teor de água nas excretas. No primeiro período, essa diferença ($P < 0,001$), resultou em um percentual de 22,12% e no segundo período de 21,30% a mais na excreção de água nas dietas com baixa energia. Cabe ressaltar que, um aumento de aproximadamente 20% na excreção de água

favorece o aumento da umidade da cama em situação de campo. Essa maior umidade pode contribuir para o aumento da incidência de problemas como lesões nas pernas, coxins plantares e peitos em aves de corte criadas nesta situação (Carré et al., 1995; Oliveira et al., 2002; Bellaver et al., 2005), o que poderia resultar em diminuição de desempenho e valor comercial dos lotes. Segundo Steinfeldt et al. (1998a) e Garcia et al. (2008), o efeito da hidratação da digesta provocado pela presença de PNAs diminui com a idade e que a adição de enzimas às dietas diminui significativamente a quantidade de água na excreta. Porém, neste trabalho a presença de enzimas e dos demais aditivos analisados nas dietas não promoveram o mesmo efeito.

Também houve efeito da energia na excreção de nitrogênio (Tab. 5). As dietas com baixa energia (farelo de trigo) apresentaram uma maior ($P < 0,001$) excreção de nitrogênio em ambos os períodos analisados. Entretanto, a presença das enzimas nas dietas com baixa energia, no período de 11 a 14 dias, reduziu esse efeito em nível estatístico, semelhante às dietas com nível de energia padrão.

Sabe-se que a umidade excessiva da cama aumenta a proliferação de micro-organismos (Nahn, 2007) e aliados a maior presença de nitrogênio aumentam a emissão de amônia para o ambiente resultando, entre outros, problemas com a qualidade do ar. Segundo Kristensen & Wathes (2000) a amônia atmosférica é o maior poluente em um ambiente de criação de frangos e pode causar desconforto ao animal e problemas, principalmente respiratórios. Além disso, a cama de aviário é muito usada como fertilizante em solos agrícolas e nestes o nitrogênio pode ser facilmente transformado a óxidos de nitrogênio e ser lixiviado para lençóis freáticos ou transportado para ambientes

aquáticos (Vitousek et al., 1997). Contudo, a poluição no solo pelo nitrogênio da cama avícola acontecerá se o solo receber continuamente, por longos anos, cama de aviário com altos níveis de nitrogênio e este estiver acima do requerido pelo solo. Assim, existe a possibilidade de redução do nitrogênio na cama de aviário, bem como de seu efeito poluente no ambiente de criação, pela utilização de enzimas em dietas com farelo de trigo.

Tabela 4- Efeito de dietas de frangos de corte na produção de dejetos e excreção de água e nitrogênio (g/animal/dia) produzido no período de 11 a 14 dias de idade

Aditivos	Produção de dejetos MN			Produção de dejetos MS			Excreção de água			Excreção de Nitrogênio		
	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média
	Níveis de energia											
Controle	59,55	74,75	67,15	16,13 ^a	19,11 ^c	17,62	43,42	55,65	49,53	0,798 ^a	0,888 ^b	0,843
Enzima	58,61	72,68	65,65	15,95 ^a	17,82 ^b	16,88	42,66	54,86	48,76	0,781 ^a	0,812 ^a	0,796
Probiótico	59,15	73,96	66,56	16,03 ^a	19,09 ^c	17,56	43,13	54,87	49,00	0,782 ^a	0,901 ^b	0,842
Enz+Prob	58,99	73,51	66,25	15,98 ^a	17,77 ^b	16,88	43,00	55,73	49,37	0,781 ^a	0,819 ^a	0,800
Média	59,08	73,73		16,02	18,45		43,05	55,28		0,785	0,855	
Probabilidades												
Energia (E)		0,001			<0,001			<0,001			<0,001	
Aditivo (A)		0,062			<0,001			0,274			<0,001	
E x A		0,756			<0,001			0,716			<0,001	
CV(%)		11,33			7,89			12,73			5,85	

Médias na mesma coluna e linha seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Matéria natural: MN; Matéria seca: MS; Energia padrão: 3050 kcal/kg e Energia baixa: 3950 kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase, xilanase, β -glutanasase; Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium*; CV: Coeficiente de variação.

Tabela 5- Efeito de dietas de frangos de corte na produção de dejetos e excreção de água e nitrogênio (g/animal/dia) produzido no período de 32 a 35 dias de idade

Aditivos	Excreção de dejetos MN			Excreção de dejetos MS			Excreção de água			Excreção de Nitrogênio		
	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média
	Níveis de energia											
Controle	136,71	171,47	154,09	34,27	41,18	37,72	103,14	130,29	116,72	1,384	1,634	1,509
Enzima	136,27	171,81	154,04	33,41	40,91	37,16	103,14	130,90	117,02	1,353	1,591	1,472
Probiótico	137,91	173,11	155,51	33,76	41,15	37,45	103,35	131,97	117,66	1,399	1,637	1,518
Enz+Prob	136,48	171,24	153,86	33,78	40,92	37,52	102,36	130,32	116,34	1,413	1,582	1,497
Média	136,84	171,91		33,89	41,04		103,00	130,87		1,388	1,611	
Probabilidades												
Energia (E)		<0,001			<0,001			<0,001			<0,001	
Aditivo (A)		0,677			0,442			0,809			0,419	
E x A		0,992			0,689			0,963			0,473	
CV (%)		11,68			9,87			12,31			8,63	

Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Matéria natural: MN; Matéria seca: MS; Energia padrão: 3150 kcal/kg e Energia baixa: 3050 kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase, xilanase, β -glucanase; Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium*; CV: Coeficiente de variação.

Como nos parâmetros anteriores, também houve o efeito da energia no coeficiente de resíduo (Tab. 6). As aves que receberam dieta com baixa energia (farelo de trigo) apresentaram um aumento significativo no coeficiente de resíduo. O ideal é que o coeficiente de resíduo seja o menor possível, para diminuir assim, o impacto ambiental da atividade avícola. Uma das estratégias utilizadas na avicultura é o uso de aditivos para aumentar a digestibilidade das dietas com conseqüente redução no coeficiente de resíduo. Neste trabalho, no período de 11 a 14 dias, as enzimas isoladas e em combinação com o probiótico nas dietas de baixa energia reduziram significativamente o coeficiente de resíduo, resultando numa diminuição percentual de 5,3%, resultados similares aos encontrados por Silva et al. (2007), que verificaram uma redução de 10% no coeficiente de resíduo, com o uso de enzimas nas dietas.

Tabela 6- Efeito de dietas de frangos de corte no coeficiente de resíduo (g dejeito MS/g GP) nos períodos de 11 a 14 e 32 a 35 dias

Aditivos	11 a 14 dias			32 a 35 dias		
	Níveis de energia					
	Padrão	Baixo	Média	Padrão	Baixo	Média
Controle	0,319 ^a	0,381 ^c	0,350	0,407	0,485	0,446
Enzima	0,315 ^a	0,358 ^b	0,336	0,403	0,482	0,443
Probiótico	0,319 ^a	0,382 ^c	0,350	0,407	0,484	0,446
Enz+Prob	0,319 ^a	0,357 ^b	0,338	0,407	0,483	0,445
Média	0,318	0,369		0,406	0,484	
Probabilidades						
Energia (E)		<0,001			<0,001	
Aditivo (A)		<0,001			0,898	
E x A		0,002			0,984	
CV(%)		8,32			9,08	

Médias na mesma linha e coluna seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Energia padrão: 3050 (11-14 dias) e 3150 (32-35 dias) kcal/kg e Energia baixa: 2950 (11-14 dias) e 3050 (32-35 dias) kcal/kg; Enzima (Enz): Amilase, xilanase, β -glutanasase; Probiótico (Prob): *Enterococcus faecium*; CV: Coeficiente de variação.

CONCLUSÃO

Neste trabalho conclui-se que, o aumento da digestibilidade das dietas para frangos de corte está relacionado com o nível de energia, a adição de aditivos nas dietas e a idade das aves. A adição das enzimas isoladas ou em combinação com probiótico, para as dietas com farelo de trigo e baixa energia é mais eficiente e necessária do que para aquelas sem farelo de trigo e com nível de energia padrão.

O método de coleta total das excretas e o método de coleta ileal da digesta apresentam os mesmos efeitos para a digestibilidade da MS, EB e para a EMA nas dietas de frangos de corte, no período de 32 a 35 dias de idade, mas o método de coleta total das excretas é capaz de aumentar ($P < 0,05$) os valores absolutos desses efeitos.

Dietas com baixa energia produzem mais ($P < 0,05$) dejetos, excreção de água, nitrogênio e aumentam significativamente o coeficiente de resíduo em relação às dietas com nível de energia padrão. Porém, com a adição de enzimas sozinhas ou em combinação com probiótico nas dietas com baixa energia, é possível baixar significativamente a produção de dejetos na MS, a excreção de nitrogênio e o coeficiente de resíduo, no período de 11 a 14 dias, minimizando seus possíveis efeitos poluentes.

BIBLIOGRAFIA

- ALMIRALL, M.; FRANCESCH, M.; PEREZ-VENDRELL, A. M.; BRUFAU, J.; ESTEVE-GARCIA, E. The differences in intestinal viscosity produced by barley and β -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v.125, p.947–955, 1995.
- ANNISON, G. Polysaccharide composition of Australian wheats and the digestibility of their starches in broiler chicken diets. *Aust. Journal Experimental Agriculture*, Cambridge, v.30, p.183-184, 1990.
- APATA, D. F. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Amsterdam, v.88, p.1253–1258, 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 12. ed., Washington, D.C.: 1995. 1094p.
- BATAL, A. B.; PARSONS, C. M. Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. **Poultry Science**, Champaign, v. 81, p.400-407, 2002.

- BELLAVER, C.; COSTA, C. A. F.; AVILA V. S.; FRAHA, M.; LIMA, G. J. M. M.; HACKENHAR, L.; BALDI, P. Substituição de farinhas de origem animal por ingredientes de origem vegetal em dietas para frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.671-677, 2005.
- BIGGS, P.; PARSONS, C. M. The effects of whole grains on nutrient digestibilities, growth performance, and cecal short-chain fatty acid concentrations in young chicks fed ground corn-soybean meal diets. **Poultry Science**, Champaign, v.88, p.1893–1905, 2009.
- CAMPBELL, G. L.; BEDFORD, M. R. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. **Canadian Journal of Animal Science**, Toronto, v.72, p.449-466, 1992.
- CARRÉ, B.; MONREDON, F.; MELCION, J. P.; GOMEZ, J. Qualité de la litière en aviculture. Aliments et caractéristiques physiques des excréta. **INRA Productions Animales**, Lion, v.8, n.5, p.331-334, 1995.
- CHOCT, M.; ANNISON, G. Antinutritive effect of wheat pentosans in broiler chicken: Role of viscosity and gut microflora. **British Poultry Science**. Cambridge, v.33, p.821–834, 1992.
- COWAN, W. D.; KORSBAK, A.; HASTRUP, T.; RASMUSSEN, P. B. Influence of added microbial enzymes on energy and protein availability of selected feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.60, p.311–319, 1996.
- GAO, F.; JIANG, Y.; ZHOU, G. H.; HAN, Z. K. The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.142, p.173–184,

2008.

- GARCIA, M.; LÁZARO, R.; LATORRE, M. A.; GRACIA, M. I.; MATEOS, G. G. Influence of enzyme supplementation and heat processing of Barley on digestive traits and productive performance of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.87, p.940–948, 2008.
- JIMÉNEZ-MORENO, E.; GONZALEZ-ALVARADO, J. M.; DE COCA-SINOVA, A.; LAZARO, R.; MATEOS, G. G. Effects of source of fibre on the development and pH of the gastrointestinal tract of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.154, p.93–101, 2009.
- JORGENSEN, H.; ZHAO, X.; KNUDSEN, K. E. B.; EGGUM, B. O. The influence of dietary fiber source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. **British Journal Nutrition**. Cambridge, v.75, p.379-395, 1996.
- KABIR, S. M. L.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. B.; AHMED, S. U. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal of Poultry Science**, Fayetteville, v.3; p.361–364, 2004.
- KRISTENSEN, H. H.; WATHES, C. M. Ammonia and poultry welfare: a review. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.56, p.235-245, 2000.
- KURVITS, T.; MARTAB, T. Agricultural NH₃ and NO_x emissions in Canada. **Environmental Pollution**, Toronto, v.102, n.1, p.187-194, 1998.
- LAURENTIS, A. C.; JUNQUEIRA, M. O.; FILARD, R. S.; ASSUENA, V.; CASARTELI, E. M.; COSTA, R. Efeito da adição da enzima fitase em rações para frangos de corte com redução dos níveis de fósforo nas diferentes fases de criação. **Ciência Rural Brasileira**, Santa Maria, v.8, n.2,

p.207-216, 2007.

MOUNTZOURIS, K. C.; TSITRSIKOS, P.; PALAMIDI, I.; ARVANITI, A.; MOHNL, M.; SCHATZMAYAR, G.; FEGEROS, K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition.

Poultry Science, Champaign, v.89, p.58-67, 2010.

MOURÃO, J. L. T. A. M.; PINHEIRO, V. M. C. Efeitos do centeio, do trigo e da suplementação com xilanases sobre o valor nutricional de dietas e o desempenho de frangos corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n.12, p.2417-2424, 2009.

NAHN, K. H. Feed formulations to reduce N excretion and ammonia emission from poultry manure. **Bioresource Technology**, Oxford, v.98, p.2282-2300, 2007.

NITSAN, Z.; BEN-AVRAHAM, G.; ZOREF, Z.; NIR, I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, Cambridge, v.32, p.515–523, 1991.

NOY, Y.; SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.74, p.366–373, 1995.

NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development in poultry. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v.6, p.344–354, 1997.

PARR INSTRUMENTS Co. **Instructions for the 1241 and 1242 adiabatic calorimeters**. Moline, EUA. 1988. 29p.

OLIVEIRA, M. C.; GOULART, R. B.; SILVA, J.C.N.S. Efeito de duas densidades e dois tipos de cama sobre a umidade da cama e a incidência de lesões na carcaça de frango de corte. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.3, n.2,

p.7-12, 2002.

- PEDROSO, A. A. **Estrutura da comunidade de bactéria do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento.** 2003. 103f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Viçosa, 2003.
- PENZ JÚNIOR, A. M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 35, Botucatu-SP. 165-178p, 1998.
- RAVINDRAN, V.; HEW, L. I.; RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W. L. A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid digestibility in food ingredients for poultry. **British Poultry Science**, Cambridge, v.40,n.2, p.266-274, 1999.
- RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ, R.; FREITAS, R.; BERTECHINI, A.; FIALHO, E. Influência sobre o tempo de coleta e metodologias sobre a digestibilidade e o valor energético de rações para aves. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.34, n.3, p.882-889, 2005.
- 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. **Tabelas brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais.** 2ª edição-Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186 p.
- SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos.** Jaboticabal: Funep, 2007, 283p.
- SILVA, B. K. R. da; PINHEIRO, C. C.; NARDI, V. K.; DAHLKE, F.; WARPECHOWSKI, M. B. Efeito da adição de enzimas em dietas com alto e

- baixo teor de fibra sobre a produção de dejetos, nitrogênio e água por frangos de corte¹. In: Zootec. 2007 – XVI Congresso Brasileiro e IV Congresso Internacional de Zootecnia, 2007, Londrina. **Anais do Zootec 2007**. Londrina: Editora universitária - UEL, 2007. 15p.
- STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES (SPSS). Version 15.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.
- STEENFELDT, S.; HAMMERSHÛJ, M.; MUÈ LLERTZ, A.; JENSEN, F. J. Enzyme supplementation to wheat-based diets for broilers. 2. Effects on growth performance and intestinal viscosity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.75, p.45-65, 1998a.
- STEENFELDT, S.; HAMMERSHÛJ, M.; MUÈ LLERTZ, A.; JENSEN, F. J. Enzyme supplementation to wheat-based diets for broilers. 2. Effects on apparent metabolisable energy content and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.75, p.45-64, 1998b.
- TERPSTRA, K.; DE HARET, N. The estimation of urinary nitrogen and faecal nitrogen in poultry excreta. Zeitschrift für Tierphysiologie. **Tierernahrung und Futtermittelkunde**, Hamburg, v.32, p.306-320, 1974.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, V.60, p.186–195, 2004.
- TOURNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. 179-199p.
- UDÉN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Science**

of Food and Agriculture, Amsterdam, v.31, p.625-632, 1980.

VITOUSEK, P. M.; ABER, A.; HOWARTH, R. W.; LIKENS, G. E.; MATSON, P. A.; SCHINDLER, D. W.; SCHLESINGER, W. H.; TILMAN, G. D. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Issues in Ecology*. **Journal of Applied Ecology**, London, v.7, n.3, p.737-750, 1997.

WALLIS, I. R.; BALNAVE, D. The influence of environmental temperature, age and sex on the digestibility of aminoacids in growing broiler chickens. **British Poultry Science**, Cambridge, v.25, p.401-407, 1984.

WANG, Z. R.; QIAO, S. Y.; LU, W. Q.; LI, D. F. Effects of supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, Champaign, v.84, p.875-881, 2005.

ZANELLA, I.; SAKOMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIREDO, A.; PACK, M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, Champaign, v.78, p.561–568, 1999.

ZHOU, Y.; JIANG, Z.; LV, D.; WANG, T. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. **Poultry Science**, Champaign, v.88, p.316-322, 2009.

CAPÍTULO V

Microbiota ileal de frangos de corte submetidos à diferentes dietas

Ileal microbiota from broilers submited to diferent diets

I. I. Santos, G. Corção, A. M. Kessler, Iaranjeira V. S., M. Lima

RESUMO

Este estudo foi conduzido para analisar as alterações do perfil microbiano da digesta íleal de frangos de corte alimentados com dietas com dois níveis de energia. A dieta com o nível de energia padrão (EP) foi baseada em milho e farelo de soja e a dieta de baixa energia (BE) com milho e os farelos de soja e trigo. Cada nível de energia recebeu quatro tratamentos: Sem aditivo; enzimas xilanase, amilase e β -glucanase; probiótico *Enterococcus faecium* e; enzimas mais o probiótico utilizados nos demais tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e cada dieta recebeu 5 repetições de 12 aves. Aos 19 dias, uma ave de cada repetição foi abatida e o conteúdo ileal coletado e armazenado em freezer. Foram feitas as extrações do DNA do micro-organismo probiótico e da microbiota ileal utilizando o kit QIAamp DNA Stool. As amostras extraídas foram amplificadas utilizando-se os oligos universais 338fCG e 518r e foi utilizada a técnica de eletroforese em gel por gradiente desnaturante para caracterização do perfil da microbiota ileal e do probiótico utilizado nas dietas. Os resultados mostraram que as dietas com BE apresentaram 21 amplicons, enquanto as dietas com EP 13 amplicons. Todos os aditivos apresentaram padrões de amplicons diferentes, com exceção das enzimas isoladas e em combinação nas dietas com EP. O perfil do micro-organismo probiótico estava ausente em todas as dietas. Conclui-se que os aditivos introduzidos às dietas foram capazes de alterar a microbiota digestiva

do lúmem ileal e o probiótico utilizado nas rações não foi capaz de colonizar o trato ileal de frangos de corte.

Palavras chave: Enzimas; DGGE; DNA, probiótico; trigo

ABSTRACT

This study was conducted to analyze the variation of the microbiological profile of the ileal digesta of broilers feed with two levels of energy. The (LE) low energy diet was based on corn, soybean meal and wheat bran and standard energy level with corn and soybean meal. Each energy level received four treatments: Without additive; Xylanase + amylase + β -glucanase enzymes; *Enterococcus faecium* probiotic and; Mix of the enzymes and probiotic used in the other treatments. The experimental design was completely randomized with 5 repetitions of 12 birds. One bird of each repetition was slaughter and the ileal content was collected and stored in freezer in the 19 days-old. The DNA extraction of probiotic microorganism and of the ileal microbiota was made. The kit QIAamp DNA Stool was used to extract the DNA of samples following the recommendations of manufacturer. The PCR was made for the amplify the V3 region of the 16S rDNA gene present in the microbial population and the technique of denaturing gradient gel electrophoresis was used for characterization of ileal microbiota profile and of the probiotic used in experimental diets. The results showed that the diets with LE presented 21 amplicons while the diets with the SE presented 13 amplicons. The diversity also was major in the BE diets (8 in LE against 7 in SP). All additives presented different standards of amplicons with exception of enzymes alone e mix with probiotic in the SE diets. The probiotic microorganism profile

was absence in every diets. In conclude, the additives inserted in the diets were able of change the digestive microbiota of ileal lumen and the probiotic used in the ration did not able to colonize the ileal trato of poultry.

Keywords: Enzymes; DGGE; DNA; probiótic; wheat

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da microbiota intestinal nos frangos está estreitamente relacionado aos ingredientes utilizados na dieta. As espécies bacterianas diferem em relação a suas preferências de substratos e suas necessidades para o crescimento. Por isso, a composição química e a estrutura da digesta determinam amplamente a distribuição da microbiota no trato digestório (Apajalahti & Kettunen, 2002; Apajalahti, 2005). A população bacteriana, em um dado momento reflete a capacidade de cada grupo bacteriano em competir com outros grupos, frente ao sistema de defesa e em determinadas condições físicas e químicas do meio. Por isso, as mudanças na composição da dieta, densidade de nutrientes, características físicas e processamento do alimento, o tipo e o nível de aditivo utilizado nas dietas podem ter efeitos significantes sobre a dinâmica da microbiota intestinal (Apajalati et al., 2001; Guo et al., 2004; Hume et al., 2003, 2006; Oviedo-Rondón et al., 2006; Parker et al., 2007), o que por sua vez influi na habilidade dos animais para digerir e absorver nutrientes. Apajalati et al. (2001) utilizando métodos moleculares analisaram microbiotas intestinais de frangos de corte, alimentados com dieta a base de trigo em oito aviários comerciais da Finlândia. Eles encontraram um efeito individual da dieta e uma forte interação (dieta x aviário) na estrutura microbiana dos cecos. Em outro estudo, comparando

frangos que receberam dietas contendo milho, sorgo, cevada, aveia e centeio, constatou-se que os animais alimentados com milho e sorgo mostraram uma menor abundância de bifidobactérias do que aquelas alimentadas com as outras dietas (Apajalahti & Kuttunen, 2002). Portanto, é possível alterar as microbiotas patogênicas e benéficas mediante mudanças nas dietas e consequentemente, na dinâmica intestinal.

Compreender e monitorar as mudanças da ecologia microbiana são pontos importantes para o desenvolvimento de métodos ou produtos que alterem e regulem a comunidade de bactérias melhorando o desempenho ou reduzindo os efeitos de estresse ou doenças. Adicionalmente, essas ferramentas podem servir para controlar patógenos presentes em ingredientes da ração, reduzir a produção de amônia e substâncias voláteis das fezes, responsáveis pelos odores nocivos no ambiente de criação. Assim, o estudo das microbiotas intestinais pode ter impacto na produção, saúde e bem estar de frangos de corte.

Existem poucos métodos disponíveis para monitorar a comunidade microbiana total do trato digestório. As bactérias suficientemente grandes podem ser vistas por microscopia de fluorescência e só algumas podem ser cultivadas em condições de laboratório. A maioria das bactérias que crescem em uma comunidade tão complexa depende de fatores de crescimento administrado por outros micro-organismos ou de secreções dos tecidos do hospedeiro. Devido à complexidade destas necessidades é comum que menos de 10% das bactérias que vivem no intestino possam ser cultivadas em condições de laboratório (Apajalahti et al, 2002). Como consequência, a maioria dos trabalhos e conclusões obtidas reflete apenas mudanças minoritárias na

população microbiana. Atualmente, técnicas baseadas em DNA têm sido utilizadas para analisar a microbiota do trato gastrointestinal. Através destas técnicas, o DNA total da microbiota de amostras do trato gastrintestinal é recuperado usando uma combinação de métodos físicos, químicos e enzimáticos (Hume et al., 2006; Oviedo-Rondón et al., 2006; Thompson et al., 2008). No presente estudo utilizou-se a eletroforese em gel por gradiente desnaturante (DGGE) para caracterização do perfil bacteriano da digesta ileal de frangos de corte e do probiótico utilizado na dieta. Para isso, foi feita a extração do DNA da amostra e a amplificação da região V3 do gene 16S rRNA presente no genoma da microbiota ileal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos aditivos (probiótico e enzimas) na microbiota ileal de frangos de corte alimentados com diferentes dietas e identificar no perfil analisado o probiótico utilizado nas dietas experimentais, verificando dessa forma se as dietas foram capazes de promover alguma mudança na microbiota e se o probiótico utilizado foi capaz de colonizar o trato digestório dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, dietas e amostras

O experimento foi conduzido com frangos machos da linhagem Ross a partir do primeiro dia de idade. Diariamente foram controladas e registradas a temperatura ambiental e a umidade relativa do ar. Foi fornecido aos animais durante todo o período experimental água clorada e ração à vontade.

As dietas experimentais foram constituídas de duas formulações, uma com nível de energia padrão, à base de milho e farelo de soja, e outra com nível baixo de energia (redução de 100 kcal/kg de EM, em relação à dieta

padrão, obtido pela inclusão de farelo de trigo) (Tab.1). Com exceção do nível de energia, as dietas apresentaram balanceamento e equivalência nos níveis dos demais requerimentos, atendendo às exigências nutricionais da espécie, de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2005). Os níveis de energia receberam quatro tratamentos: 1- Controle (sem aditivo); 2- enzimas (xilanase, amilase e β -glucanase); 3- probiótico (*Enterococcus faecium* - 10^{10} UFC/g) e; 4- enzimas mais o probiótico utilizados nos tratamentos 2 e 3 (Tab. 1). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com o esquema fatorial 2x4 (dois níveis de energia e quatro aditivos) e cada dieta recebeu 5 repetições de 12 aves.

Aos 19 dias uma ave de cada repetição foi abatida, o íleo foi exposto a partir de 4 cm anteriores a região íleo-ceco-cólica, a digesta ileal foi coletada e armazenada em freezer (-24°C). Posteriormente, as amostras foram descongeladas, as repetições de cada tratamento juntadas e homogeneizadas para a extração do DNA total das amostras.

Tabela 1- Composição e níveis nutricionais calculados para as dietas experimentais de frangos de corte

INGREDIENTES (%)	Nível Padrão de Energia	Nível Baixo de Energia
Milho	58,46	52,38
Farelo de soja 46	34,08	32,66
Farelo de trigo	-	7,54
Óleo de soja	3,08	3,08
Calcáreo	1,36	1,39
Fosfato bicálcico	1,72	1,63
Sal comum	0,46	0,46
Premix vitamínico	0,04	0,04
Premix mineral	0,08	0,08
Lisina	0,29	0,30
DL-Metionina	0,27	0,28
Aditivos*	0,05	0,05
Colina 60	0,060	0,06
Monensina 20%	0,05	0,05
EM (kcal/kg)	3050	2950
PB	21	21
FB	3,25	3,75
Ca	0,95	0,95
Pdisponível	0,45	0,45
Sódio	0,20	0,20
Lisina Total	1,29	1,29
Metionina Total	0,57	0,57
Triptofano Total	0,27	0,27
Colina (mg/kg)	1500	1500

* Probiótico *Enterococcus faecium* - 10^{10} UFC/g (Cilactin®): 30 g/ton; Mistura de enzima xilanase (Ronozyme® WX): 100 g/ton e amilase + β -glucanase (Ronozyme® A): 400 g/ton.

Extração do DNA do probiótico e da microbiota ileal

Para a extração do micro-organismo probiótico, 3 g de probiótico foram adicionadas a um tubo de ensaio contendo 10 mL do meio caldo verde brilhante e cultivado em estufa a 37 °C por 24 h. A partir de então, 1,2 mL do cultivo foi transferido a um eppendorf, centrifugado a 4000 rpm por 2 minutos e coletado o precipitado. Este foi lavado com solução salina (0,9%) duas vezes para posterior extração do DNA. A extração do probiótico, assim como da microbiota ileal dos tratamentos foi realizada utilizando-se o kit QIAamp DNA Stool (Qiagen®, São Paulo, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. A integridade total do DNA foi checada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % com brometo de etídeo (0,5 µL/mL). As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -10 °C.

Amplificação do DNA

Para a amplificação dos fragmentos específicos da região V3 do gene 16S rRNA do micro-organismo probiótico e da microbiota ileal utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores: BA338fCG (5' CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (Pedroso et al., 2005). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi conduzida em um volume de 25 µL contendo 0,2 mM de cada nucleotídeotri-fosfatase (dNTP), 2,5 mM de MgCl₂, 5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0 U de *Taq* DNA polimerase, tampão DNA polimerase 10X e 200 ng de DNA. Todas as reações foram feitas em duplicata. A PCR do DNA probiótico e da microbiota ileal foi feita seguindo o protocolo utilizado por Thompson et al. (2008): 1 ciclo de 94 °C por 3 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 65 °C por 1 min (diminuindo 0,5 °C por ciclo), e 72 °C

por min;1 ciclo de 72 °C por 7 min. Uma alíquota dos produtos da PCR foi analisada em gel de agarose 0,8%.

Eletroforese em gel por gradiente Desnaturante – DGGE

A DGGE foi conduzida de acordo com as recomendações descritas por Muyzer et al. (1993). Para separar os fragmentos amplificados pela PCR, um gel de 8% poliacrilamida:bisacrilamida (37:5:1) foi preparado contendo um gradiente desnaturante variando de 15 a 55%, usando duas soluções: solução 100% de desnaturação contendo 40% formamida e 7 M de uréia e, solução 0% desnaturante, sem uréia ou formamida (Ovreas et al., 1997). A DGGE foi realizada utilizando-se o equipamento DCode (BioRad) em gel de 16 x 16 x 0,1 cm e tampão TAE 1X (a partir de TAE 50X: 20 mM Tris-acetato, 10 Mm acetato de sódio, 0,5 mM EDTA - pH 8,0). As reações de PCR foram juntadas e um volume de 42 µL do produto de PCR de cada amostra foi adicionado individualmente a cada canaleta do gel. A eletroforese foi realizada a 100V e 60 °C por 16 h. Os géis foram corados em solução de TAE 1X:Brometo de etídio (0,5 µg/mL), analisados em luz ultravioleta com captura de imagem por meio digital (Kodak 1D image Analysis).

Análise de dados

A partir da análise dos amplicons detectados nas diferentes amostras montou-se uma matriz de presença ou ausência e os tratamentos foram agrupados hierarquicamente por dendrograma, com base no seu perfil eletroforético. Para isso, utilizou-se o programa NTsyspc software, version 2.0 for Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1, encontra-se o gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante submetido à eletroforese (DGGE). Em cada coluna do gel verifica-se o padrão de bandas (amplicons) relativo às microbiotas presentes na digesta ileal de frangos de corte. As bandas com maior intensidade representam populações mais abundantes e as de menor intensidade, as menos abundantes. Na figura 2 encontra-se o dendrograma, no qual pode-se observar os grupamentos formados pela similaridade genotípica das microbiotas de cada tratamento analisado. Percebe-se que os aditivos foram capazes de alterar a microbiota da digesta ileal e que as dietas com baixa energia favorecem a existência de um número maior de amplicons, o qual pode estar associado a um maior número de espécies bacterianas no lúmen ileal dos animais. Estas dietas apresentavam farelo de trigo em sua composição, ingrediente com grande quantidade de polissacarídeos não amiláceos solúveis (PNAs). Normalmente, os PNAs diminuem o trânsito de passagem da digesta no trato intestinal a ponto dos micro-organismos serem capazes de competir por nutrientes com o animal, tendo dessa forma mais condições para sua reprodução e aumento da população (Apajalahti et al, 2002; Shakouri et al., 2009).

Nas dietas de baixa energia (BE), somente no tratamento com o probiótico, o amplicon 4 não foi detectado, possivelmente este aditivo inibiu o desenvolvimento desta microbiota, porém, apresentou em comum os amplicons 1, 2, 3, 5 e 6 em relação ao tratamento controle. Os perfis de bandas destes tratamentos estão relacionados entre si com um coeficiente de similaridade de aproximadamente 88%. A presença das enzimas na dieta favoreceram a

presença do amplicon 7, o reaparecimento do amplicon 4 e um aumento na intensidade do amplicon 6. Este tratamento apresentou um coeficiente de similaridade em relação às dietas controle e probiótico de aproximadamente 93% e 88%, respectivamente. Porém, quando em combinação com o probiótico, as enzimas favoreceram o aparecimento do amplicon 8, além da presença dos amplicons 3 e 5, sendo esses últimos também encontrados nas demais dietas. Contudo, a combinação das enzimas com o probiótico foi capaz de inibir os amplicons 1, 2, 4, 6 e 7, encontradas nas dietas com os demais aditivos, resultando numa similaridade bastante baixa (50%) em relação aos demais tratamentos. As enzimas exógenas em dietas com alta concentração de PNAs aumentam a digestibilidade das dietas, diminuindo o fluxo de passagem e disponibilizando menos nutrientes para a reprodução e proliferação de micro-organismos no trato intestinal do animal. Além disso, alguns micro-organismos beneficiados diretamente com uma determinada dieta podem produzir substâncias que favoreçam ou inibam o aparecimento de outras espécies (Collier et al., 2003; Servin, 2004).

Nas dietas com energia padrão (EP), no tratamento controle, os amplicons 1, 3, 4, 8, 9 e 10 foram observados. No tratamento com probiótico houve o favorecimento da presença dos amplicons 11 e a inibição dos amplicons 1, 8, 9 e 10 encontrados no controle. Apenas os amplicons 3 e 4 foram comuns aos dois tratamentos, resultando numa similaridade de aproximadamente 45%. A maior alteração microbiana nas dietas com EP foi encontrada nos tratamentos com enzimas isoladas e em combinação com o probiótico. Esses tratamentos favoreceram apenas o predomínio dos amplicons 3 e 5, inibindo a presença dos outros amplicons encontrados nas demais dietas.

Este padrão de amplicons resultou numa similaridade, bastante baixa, de aproximadamente 37%, em relação aos demais tratamentos.

No probiótico comercial (*E. faecium*) foi encontrado o amplicon 12. A presença deste amplicon não foi constatada em quaisquer dietas avaliadas. Contudo, a microbiota foi alterada quando apresentou probiótico na dieta com energia padrão (sem farelo de trigo) e quando em associação com as enzimas nas dietas de baixa energia (com farelo de trigo). Acredita-se que o probiótico promova um efeito antagônico ou sinérgico em relação à microbiota dessas dietas, devido provavelmente às várias bacteriocinas que produz. Porém, não foi suficientemente competitivo para manter-se em quantidade expressiva a ponto de colonizar o lúmem ileal.

Foram encontradas nas dietas avaliadas 11 amplicons diferentes. Este baixo número pode ser explicado pela comigração de alguns fragmentos com pares de bases pouco distintos (Jackson et al., 2002) ou conteúdo C+G bastante semelhantes (Simpson et al., 1999). Zhu & Joerger (2003) identificaram 243 diferentes sequências de bactérias a partir do gene 16S rRNA presentes no conteúdo cecal de frangos de corte, através de técnicas de clonagem e sequenciamento, porém visualizaram através do DGGE apenas 20 amplicons.

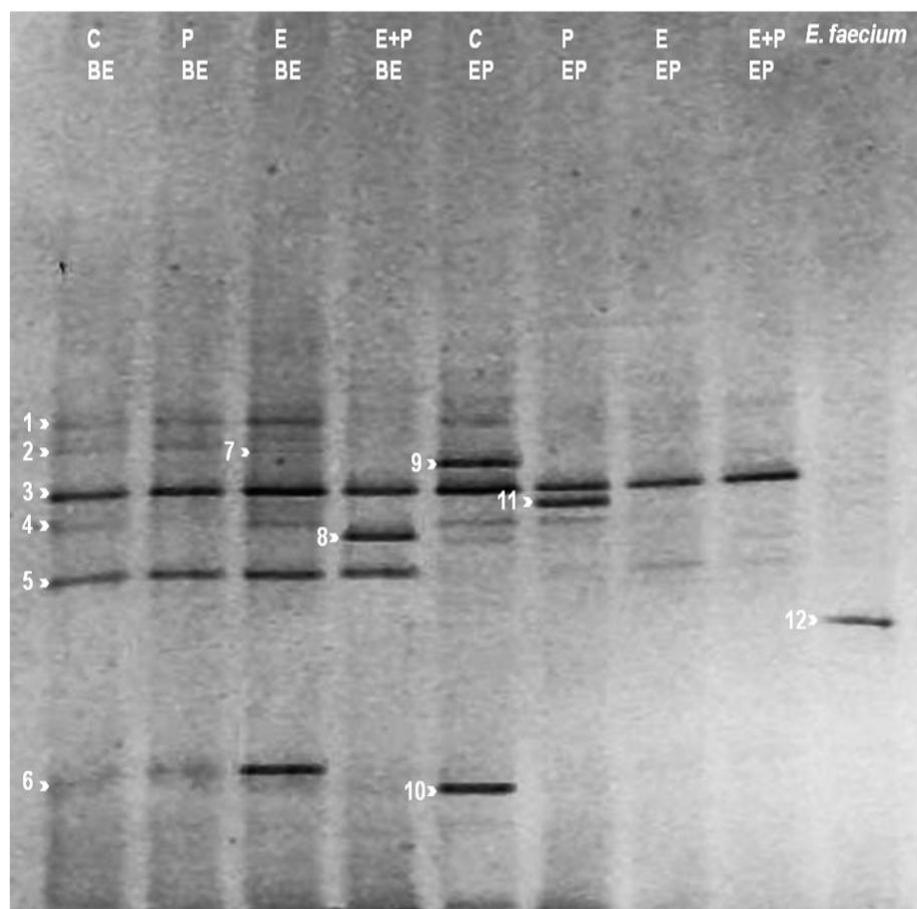


Figura 1. DGGE do produto de PCR da região V3 do gene 16S do rRNA de amostras da digesta ileal de frangos de corte, alimentados com dietas contendo dois níveis de energia (Energia padrão-EP e Baixa energia-BE) e diferentes aditivos: Controle (C), Probiótico (P), Enzima (E), Enzima + probiótico (E+P).

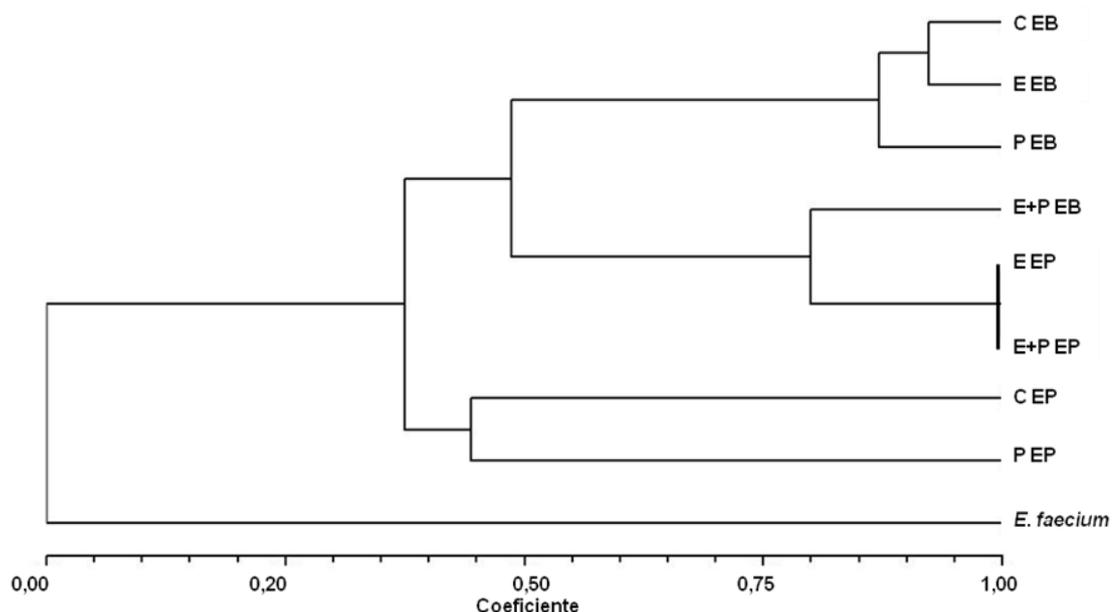


Figura 2. Dendrograma dos amplicons obtidos pelo DGGE do PCR da região V3 do gene 16S do rDNA de amostras da digesta ileal de frangos de corte alimentados com dietas contendo dois níveis de energia (Energia padrão-EP e Baixa energia-BE) e diferentes aditivos: Controle (C), Probiótico (P), Enzima (E), Enzima +probiótico (E+P).

CONCLUSÃO

Os aditivos introduzidos às dietas para frangos de corte são capazes de alterar a população microbiana do lúmem íleal.

O probiótico utilizado não foi capaz de colonizar o trato ileal de frangos de corte.

BIBLIOGRAFIA

APAJALAHTI J. H. A.; KETTUNEN, A; BEDFORD, M. R.; HOLBEN, W. E.

Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, Washigton, v.67, p.5656-5667, 2001.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves. In: XVII CURSO DE ESPECIALIZACION

FEDNA, 2002, Barcelona. Disponível

em:<http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/2002CAP_III.pdf>. Acesso em: 23/03/2007.

APAJALAHTI, J. Comparative Gut Microflora, Metabolic Challenges, and Potential pportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaing, v.14, p.444–453, 2005.

APAJALAHTI, J. H.; KETTUNEN, H.; KETTUNEN, A.; HOLBEN, W. E.; NURMINEN, P. H.; RAUTONEN, N.; MUTANEN, M. Culture-independent microbial community analysis reveals that inulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. **Applied Environmental Microbiology**, Washigton, v.68, p.4986-4995, 2002.

COLLIER, C. T.; VAN DER KLIS, J. D.; DEPLANCKE, B.; ANDERSON, D. B.; GASKINS, H. R. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washigton, v.47, p.3311–3317, 2003.

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

HUME, M. E.; CLEMENTE-HERNÁNDEZ, S.; OVIEDO-RONDÓN, E. O. Effects of feed additives and mixed *Eimeria* species infection on intestinal microbial ecology of broilers. **Poultry Science**, Champaing, v.85, p.2106-2111, 2006.

HUME, M. E.; KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; DONSKEY, C. J.; MOORE, R. W.; RICKE, S. C.; NISBET, D. J. Poultry digestive microflora biodiversity

- as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. **Poultry Science**, Champaign, v.82, n.7, p.1100-1107, 2003.
- JACKSON, M. D.; GOULD, S. J.; ZABRISKIE, T. M. Studies on the formation and incorporation of streptolidine in the biosynthesis of the peptidyl nucleoside antibiotic streptothricin F. **The Journal of Organic Chemistry**, Utah, v.67, p.2934–2941, 2002.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.695–700, 1993.
- OVIEDO-RONDÓN, E. O.; HUME, M. E.; HERNÁNDEZ, C.; CLEMENTE-HERNÁNDEZ, S. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. **Poultry Science**, Champaign, v.85, p.854-860, 2006.
- OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.3367–3373, 1997.
- PARKER, J.; OVIEDO-RONDÓN, E. O.; CLEMENTE HERNÁNDEZ, S.; OSBORNE, J.; REMUS, J. C.; KETTUNEN, H.; MAKIVUOKKO, H.; PIERSON, E. M. Enzymes as feed additive to aid in responses against *Eimeria* spp in coccidia vaccinated broilers fed corn-soybean meal diets with different protein levels. **Poultry Science**, Champaign, v.86, p.643-653, 2007.

- PEDROSO, A. A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, M. R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v.15, p.232–237, 2005.
- 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. **Tabelas brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2ª edição-Viçosa: UFV. Departamento de Zootecnia, 2005. 186 p.
- SHAKOURI, M. D.; IJI, P. A.; MIKKELSEN, L. L.; COWIESON, A. J. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.93, 647-658, 2009.
- SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, London, v.28, p.405–440, 2004.
- SIMPSON, J. M.; MCCRACKEN, V. J.; GASKIN, H. R.; MACKIE, R. I. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. **Journal of Microbiological Methods**, Washington, v.36, p.167–179, 1999.
- THOMPSON, K.; BURKHOLDER, K.; PATTERSON, J.; APPLGATE, J. T. Microbial ecology shifts in the ileum of broilers during feed withdrawal and dietary manipulations. **Poultry Science**, Champaign, v.87, p.1624-1632, 2008.
- ZHU, X. Y.; JOERGER, R. D. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ

hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes.

Poultry Science, Champaign, v.82, p.1242–1249, 2003.

CAPÍTULO VI

1.CONCLUSÃO GERAL

Em dietas com milho e farelo de soja, o probiótico e óleos essenciais não promoveram benefícios de desempenho, de integridade da mucosa e de morfometria intestinal aos animais que sofreram estresse infeccioso por *Eimeria maxima* e *E. acervulina*.

Em dietas com diferentes níveis de energia, o probiótico também não se mostrou eficiente aos animais sob quaisquer parâmetros analisados. Este também não foi detectado por DGGE no trato ileal dos animais que o consumiram na dieta, sendo menos competitivo que os demais microorganismos presentes no conteúdo ileal. Contudo, tanto nas dietas contendo probiótico, quanto naquelas contendo enzimas foram verificadas alterações na microbiota do conteúdo ileal dos animais. As enzimas mostraram eficiência nas dietas de baixa energia (que continham farelo de trigo em sua composição). A adição de enzimas diminuiu ($P<0,05$) os parâmetros de morfometria e pH do trato gastrointestinal, melhorou ($P<0,05$) a digestibilidade da dieta e diminuiu ($P<0,05$) a produção de dejetos no ambiente de criação. Contudo, essa eficiência só foi verificada no período inicial das aves (14 dias).

2.CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição da mistura de óleos essenciais utilizado no experimento do cap. II, não foi divulgada pelo fabricante, sabendo-se apenas que foi extraído de plantas de tomilho e cravos-da-índia, cujos principais princípios ativos são timol e eugenol, respectivamente. Na literatura encontra-se

efeito destes dois princípios ativos, principalmente contra *Clostridium perfringens* (Mitsch et al., 2004), um patógeno oportunista causador de infecções intestinais em frangos de corte e, contra a coccidiose causada por *Eimeria tenella* (Giannenas et al., 2003). Contudo, no trabalho de Mitsch et al. (2004), o timol e o eugenol estavam em combinação na dieta com outros princípios ativos, como a curcumina, a piperina e o carvacrol e no trabalho de Giannenas et al. (2003) o timol estava em combinação com o carvacrol.

Como exposto na revisão bibliográfica do cap. I, existe o efeito sinérgico ou antagônico entre os componentes principais (em maior nível) e os de menor representatividade presentes nos óleos essenciais, que pode potencializar ou reduzir a ação antimicrobiana. O sinergismo entre o carvacrol e seu precursor *p*-cineme sob células vegetativas de *Bacillus cereus* foi demonstrado por Ultee et al. (2002). O *p*-cineme tem um efeito antimicrobiano, capaz de aumentar a permeabilidade das membranas das células bacterianas, favorecendo o transporte do carvacrol para o interior das células.

A mistura de cinamaldeído e eugenol (250 e 500 µg/mL, respectivamente), inibiram o crescimento de *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Enterobacter* sp. por mais de 30 dias, enquanto esses compostos aplicados individualmente não demonstraram esse mesmo efeito (Moleyar & Narasimham, 1992). Assim, o efeito do timol e do eugenol contra coccídios pode ser evidenciado ou potencializado pela presença de outros princípios ativos, como o carvacrol ou não se manifestar quando utilizados sozinhos nas dietas.

Neste trabalho verificou-se que o micro-organismo probiótico, mesmo detectado por DGGE no probiótico enviado pelo fabricante, não foi capaz de

colonizar o trato ileal das aves em quaisquer dietas analisadas. Os probióticos a base de *Enterococcus faecium* têm ação comprovada em trabalhos realizados com frangos de corte (Henrique et al., 1998; Mountzouris et al., 2007; Shin, et al.; 2008), porém sua eficácia também é contestada (Gonzales, 1998; Loddi et al., 2000). Como mencionado na revisão do cap. I, a ação efetiva dos probióticos está condicionada às interações existentes no TGI do animal (Remhan et al., 2007) e também a multifatores, tais como, a viabilidade da cepa microbiana, o nível e a forma de administração, a frequência de aplicação, o tipo de dieta, a idade da ave, condições de higiene do sistema de produção e fatores estressantes (Mountzouris et al., 2010). Analisando-se todas essas variáveis descartou-se o fator nível de administração, pois a dose utilizada seguiu as recomendações do fabricante e está de acordo com o recomendado na literatura (Patterson & Burkholder, 2003; Apata, 2008; Mountzouris et al., 2010). Quanto à frequência de administração, esta dificilmente impediria a eficiência do probiótico, uma vez que este foi administrado a partir do primeiro dia de idade das aves até o abate e a coleta para o DGGE foi feita aos 19 dias de idade, quando a população microbiana já estava estabilizada. A ineficácia do probiótico em relação à dieta controle se mostrou tanto nas dietas com milho/farelo de soja, quanto nas dietas com milho/farelos de soja e trigo; tanto em condições de estresse (experimento do cap. I) como na ausência deste (experimento do cap. III, IV e V), restando poucos fatores a serem analisadas. Ficaram às interações existentes no TGI do animal (Remhan et al., 2007) e a viabilidade do *E. faecium* contido no probiótico. Em relação ao primeiro fator, provavelmente, o micro-organismo probiótico não teve poder de competição, em relação aos demais micro-organismos, frente à produção de enterotoxinas

das bactérias intestinais e as secreções produzidas na mucosa do TGI. Em relação à segunda variável, é possível que o probiótico não expressasse a tolerância necessária às enzimas salivares, ácidos gástricos, sais biliares e ácidos orgânicos voláteis do TGI, dificultando sua rápida proliferação e então, adequada colonização após sua ingestão, sendo incapaz de inibir patógenos e ter condições de resistência ao peristaltismo.

As enzimas se mostraram eficientes apenas nas dietas com baixa energia, as quais se diferenciaram das dietas com nível de energia padrão pela inclusão do farelo de trigo na composição. Porém, essa eficiência só foi constatada na fase inicial de desenvolvimento das aves (14 dias). Alguns autores encontraram eficiência das enzimas nas fases inicial e de crescimento, contudo, essa eficiência foi mais expressiva na fase inicial (Steenfeldt et al., 1998a; Zhou et al., 2009). Segundo Nitsan et al. (1991) e Noy & Sklan (1997), as aves jovens apresentam limitações das atividades das enzimas digestivas e das funções do trato gastrointestinal, contudo a medida que crescem aumentam a produção das enzimas endógenas, aumentando também a absorção de aminoácidos e energia pelo desenvolvimento do trato gastrintestinal (Noy & Sklan, 1995). Olukosi et al. (2007) observaram uma maior retenção da matéria seca, energia e nitrogênio com o aumento da idade. Eles concluíram que os frangos jovens são mais beneficiados com a ação das enzimas exógenas, já que em aves mais velhas a retenção de nutrientes diminui e a eficiência da enzima fica menos evidente. Contudo, a resposta da enzima também pode ser explicada pela composição da dieta. O benefício obtido com as enzimas nas dietas de baixa energia pode estar atrelado à presença do farelo de trigo na composição destas dietas. Em geral o farelo de trigo apresenta uma grande

quantidade de PNAs em sua composição. Quando introduzido nas dietas, geralmente aumenta a viscosidade da digesta, baixando a digestibilidade da dieta e o desempenho dos animais. Já no milho a presença de PNAs é bem menor e os efeitos adversos são menos intensos, o que o torna mais digestível em relação ao farelo de trigo. Essa característica favorece a eficiência das enzimas exógenas para dietas com farelo de trigo, pois o percentual de digestibilidade do milho já é alto, assim a margem de aumento conseguida com a introdução de enzimas se torna menor (Amerah et al., 2008) em relação a digestibilidade do farelo de trigo.

3.BIBLIOGRAFIA

- ACOMOVIC, T.; McCLEARY, B. V. Optimising the response. **Feed Mix**, Cambridge, v.4, p.4, p.14-19, 1996.
- AKIBA, J.; NAKAMURA, M.; NAGATA, H.; KAUNITZ, J. D.; ISHII, H. Acid-sensing pathways in rat gastrointestinal mucosa. **Journal of gastroenterology**, Tokyo, v.37, p.133-138, 2002.
- ALCICEK, A.; BOZKUT, M.; CABUK, M. The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in turkey and broilers. **South African Journal of Animal Science**, Johannesburgo, v.33, p.89-94, 2004.
- ALCICEK, A.; BOZKUT, M.; CABUK, M. The effect of herbal essential oils, an organic acid or a probiotic on broiler performance. **South African Animal Science**, Johannesburgo, v.34, p.217-222, 2003.
- AMERAH, A. M.; RAVINDRAN, V.; LENTLE, R. G; THOMAS, D. G. Influence of feed particle size on the performance, energy utilization, digestive tract development, and digesta parameters of broiler starters fed wheat- and corn-based diets. **Poultry Science**, Champaign, v.87, p.2320–2328, 2008.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; CURI, P. R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.49, p.661–672, 1997.

- APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves. In: XVIII CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA. Barcelona, Nov. 2002. p.39-51
- APAJALAHTI, J. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v.14, p.444–453, 2005.
- APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHA, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.60, p.223–232, 2004.
- APATA, D. F. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Amsterdam, v.88, p.1253–1258, 2008.
- ARBUCKLE, J. B. R. The attachment of *Clostridium welchii* (*Clostridium perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. **Journal of Pathology**, Oxford, v.6, p.65-72, 1972.
- AUDISIO, M. C.; OLIVER, G.; APELLA, M. C. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.63, p.235–241, 2001.
- 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**, Champaign, v.88, p.49–55, 2009.
- BABA, E.; FULLER, A. L.; GILBERT, J. M.; THAYER, S. G.; McDOUGALD, L. R. Effect of *Eimeria brunetti* infection and dietary zinc on experimental induction of necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Disease**, Jacksonville, v.36, p.59-62, 1992.
- BAR-SHIRA, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. **Developmental & Comparative Immunology**, Aberdeen, v.27, p.147–157, 2003.
- BATAL, A. B.; PARSONS, C. M. Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. **Poultry Science**, Champaign, v.81, p.400-407, 2002.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common fragrance and flavor material: Preparation, properties and uses**, fourth ed. Wiley-VCH, Weinheim. 2001.
- BEDFORD, M. R.; MORGAN, A. J. The use enzymes in poultry diets. **World's**.

Poultry Science Journal, Cambridge, v. 52, p. 61-68, 1996.

BJERRUM, L.; PEDERSEN, K.; ENGBERG, R. M. The influence of whole wheat feeding on salmonella infection and gut composition in broiler. **Avian Disease**, Jacksonville, v.49, p.9-15, 2005.

BORGES, F. M. Utilização de enzimas em dietas avícolas. **Cadernos Tecnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, n. 20, p. 5-30, jun. 1997.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94, p.223-253, 2004.

BUTOLO, J. E. Utilização de ingredientes líquidos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Anais...** Campinas: CBNA, p. 295-334, 2001.

CHAO, S. C.; TONG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essential Oil Research**, Oxford, v.12, p.639-649, 2000.

CHESSON, A. Non starch polysaccharide degrading enzymes in poultry diets: influence of ingredients on the selection of activities. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.57, n.3, p.251-263, 2001.

CHOCT, M.; HUGHES, R. J.; BEDFORD, M. R. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and cecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. **British Poultry Science**, Cambridge, v.40, p.419-422, 1999.

CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P.; GIANNENAS, I.; PAPAZHARIADOU, M.; BOTSOGLOU, N.; SPAIS, A. B. Effect of a mixture of herbal extracts on broiler chickens infected with *Eimeria tenella*, **Animal Research**, Les Ulis, v.53, p.137-144, 2004.

ÇIFTÇI, I.; YENICE, E.; ELEROGLU, H. Use of triticale alone and in combination with wheat or maize: effects of diet type and enzyme supplementation on hen performance, egg quality, organ weights, intestinal viscosity and digestive system characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.105, p.149-161, 2003.

Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. Microingredientes: Microingredientes na alimentação animal. Campinas: CBNA, 2009. p.1-46.

COOK, R. H.; BIRD, F. H. Duodenal villus area and epithelial cellular migration in convention and germ-free chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.52, p.2276-2280, 1973.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.;

- ARZEDI, E.; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.29, p.130-135, 1999.
- COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.4, p.564-582, 1999.
- CROSS, D. E.; HILLMAN, K.; McDEVITT, R. M.; ACAMOVIC, T. Effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil as an in vivo dietary supplement on chicken intestinal microflora. In: **Proceeding** of the 33 International Symposium on Essential Oils, Lisbon, Portugal. 2002.
- CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, London, v.34, n.4, p.245-253, 2002.
- DALE, N. Probióticos para aves. **Avicultura profissional**, Geórgia, v.10, p.88-89, 1992.
- DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S.; SHELLEM, T. A.; DOERR, J. A. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. **Poultry Science**, Champaign, v.82, n.1, p.62-66, 2003.
- DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, Philadelphia, v.73, n.2(S), p.421-429, 2001.
- DELAQUIS, P. J.; ATANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.74, p.101-109, 2002.
- DEMIR, E.; SARICA, S.; OSCAN, M. A.; SUICMEZ, M. The use of natural feed additives as alternatives for antibiotics growth promoter in broiler diets. **British Poultry Science**, Cambridge, v.44(S), p.44-45, 2003.
- DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. **International Dairy Journal**, Wisconsin, v.15, p.973-988, 2005.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Applied Microbiology**, London, v.88, p.308-316, 2000.
- DOS SANTOS, I. I.; POLI, A.; PADILHA, M. T. S. Desempenho zootécnico e rendimento de carcaça de frangos de corte suplementados com diferentes probióticos e antimicrobianos. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá,

v.26, n.1,p.29-33, 2004.

ECOLOGY HEALTH CENTER. Probiotics Acidophilus with *E. faecium*: Natural Factors. Disponível em <<http://www.crohns.net>>. Acesso em: 01/07/2010.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, Champaing, v.83, p.580–590, 2004.

EVANS, J. W.; PLUKETT, M. S.; BANFIELD, M. J. Effect of an essential oil blend on coccidiosis in broiler chickens, 2001. **Poultry Science**, Champaing, v.80, p.258, 2001.

FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; LADEIRO, F.; VENANCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J. C.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.36, p.35-40, 2002.

FERNANDES, P. C. C. Lactobacillus sp. na alimentação de bezerros pré-ruminantes. In: CADERNO TÉCNICO DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, Belo Horizonte: **Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, p. 5, 1995.

FIREMAN, F. A. T.; FIREMAN, A. K. T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.173-178, 1998.

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

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

GAO, F.; JIANG, Y.; ZHOU, G. H.; HAN, Z. K. The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.142, p.173–184, 2008.

GARCIA, M.; LAZARO, R.; LATORRE, M. A.; GRACIA, M. I.; MATEOS, G. G. Influence of enzyme supplementation and heat processing of barley on digestive traits and productive performance of broilers. **Poultry Science**, Champaing, v.87, p.940–948, 2008.

GARCIA, O. Enzimas: recentes contribuições para a sua aplicação em nutrição animal. In: ENCONTRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 3., 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 1997. p.1-9.

GARCÍA V.; CATALÁ-GREGORI, P.; HERNÁNDEZ, F.; MEGÍAS, M. D.; MADRID, J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient

- digestibility, intestine mucosa morphology and meat yield of broilers. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v.16, p.555-562, 2007.
- GIANNENAS, I. A.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N. A.; SPAIS, A. B. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives of Animal Nutrition**, Cambridge, v.57, p.99-106, 2003.
- GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food microbiology**, London, v.73, p.83-92, 2002.
- GONZALES, E. Efeito da adição de probiótico e antibiótico como promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. *In: XXXV REUNIAO ANUAL DA SBZ*, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, p. 189-191.
- GRAHAM, H.; INBORR, J. Stability of enzymes during processing. **Feed Mix**, Cambridge, v.1, p.18, 1993.
- GRIGGS, J. P.; JACOB, J. P. alternatives to antibiotics for organic poultry production. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v.14, p.750–756, 2005.
- GUSILS, C.; CHAIA, A. P.; GONZÁLEZ, S.; OLIVER, G. *Lactobacillus* isolated from chicken intestines: potencial use as probiotics. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.62, p.252-256, 1999.
- HENRIQUE, A. P.; FARIA, D.; FRANZOLIN, R. Uso de probióticos e antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte. *In:35 REUNIÃO ANUAL DA SBZ*, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, p.297-299.
- HERNANDÉZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V.; ORENGO, J.; MEGIAS, M. D. Influence of two plant extracts on broiler performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, Champaign, v.83, p.169-174, 2004.
- HIGGINS, S. E.; HIGGINS, J. P.; WOLFENDEN, A. D.; HENDERSON, S. N.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; TELLEZ, G.; HARGIS, B. Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella* enteritidis in neonatal broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.87, p.27–31, 2008.
- HIRAOKA, T.; FUKUWATARI, T.; IMAIZUMI, M.; FUSHIKI, T. Effects of oral stimulation with fats on the cephalic phase of pancreatic enzyme secretion in esophagostomized rats. **Physiology Behavior**, Amsterdam, v.79, p.713-717, 2003.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, Alberta, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

- HUANG, M. K.; CHOI, Y. J.; HOUDE, R.; LEE, J. W.; LEE, B.; ZHAO, X. Effects of Lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.83, p.788–795, 2004.
- HÜBNER, K.; VAHJEN, W.; SIMON, O. Bacterial responses to different dietary cereal type and xylanase supplementation in the intestinal of broiler chickens, ducks and geese. **Archives of Animal Nutrition**, Cambridge, v.56, p.167-187, 2002.
- HUME, M. E.; CLEMENTE-HERNÁNDEZ, S.; OVIEDO-RODÓN, E. O. Effect of feed additives and mixed *Eimeria* species infection on intestinal microbial ecology of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.85, p.2106-2111, 2006.
- IBRIR, F.; GREATHEAD, H. M. R.; FORBES, J. M. The effect of thymol/carvacrol treatments on the performance of broilers chickens infected with *Eimeria acervulina*. **Proceedings of Nutrition Society**, London, 2002. 61p.
- INTERNATION UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - **IUPAC**. Recommendations on organic & biochemical nomenclature, symbols & terminology, etc. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>>. Acesso em: 11/07/ 2005.
- JAMROZ, D.; JAKOBSEN, K.; BACH KNUDSEN, K. E.; WILCZKIEWICZ, A.; ORDA, J. Digestibility and energy value of the non-starch polysaccharides in young chickens, ducks and geese, fed diets containing high amounts of barley. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.131, p.657–668, 2002.
- JAMROZ, D.; ORDA, J.; KAMEL, C. I; WILCZKIEWICZ, A.; WERTELECKI, T.; SKORUPINSKA, J. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, and gut microbial status in broilers chickens. **Journal of Animal Feed Science**, Champaign, v.12, p.583-596, 2003.
- JAMROZ, D.; WERTELECKI, T.; HOUSZKA, M.; KAMEL, C. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chickens. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.90, p.255-268, 2006.
- JANG, I. S.; KO, H. Y.; KANG, S. Y.; LEE, C. Y. Effect of commercial essential oils on growth performance, digestive enzymes activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Food Science and Technology**, Amsterdam, v.134, p.304-315, 2007.
- JENSEN, L. S. Historical perspective of enzymes from an earlier researcher.

Poultry International, Lansdale, p.2-8, 1998.

JERKOVIC, I.; MASTELIC, J.; MILOS, M. The impact of both season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v.36, 649-654, 2001.

JEURISSEN, S. H.; LEWIS, F.; VAN DER KLIS, J. D.; MROZ, Z.; REBEL, J. M.; TER HUURNE, A. A. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norwich, v.3, p.1–14, 2002.

JIN, L. Z.; HO, T. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.53, p.351-368, 1997.

JONES, C. D.; THOMAS, C. N. The maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing stable bacteria. In: LYONS, T. P. (ed.) **Biotechnology in the feed industry**. Nicholasville: Alltech Technical Publication, p.157-166, 1987

JONG, E. U.; LEBOUTE, E. M.; CIOCCA, M. L.; PENZ JÚNIOR, A. M. Uso de avoparcina e virginiamicina como promotores de crescimento em rações de frango de corte. 1. Efeito sobre o desempenho produtivo e utilização da energia da ração. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.14, p.529-535, 1985.

JÓZEFIAK, D.; RUTKOWSKI, A.; JENSE, B. B.; ENGBERG, R. M. Effects of dietary inclusion of triticale, rye and wheat and xylanase supplementation on growth performance of broiler chickens and fermentation in the gastrointestinal tract. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.132, p.79–93, 2007.

JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE, F. K. Probióticos e qualidade. **Aveworld**, Campinas, v.35, p.44-48, 2008.

JUNQUEIRA, O. M.; BARBOSA, L. C. G. S.; PEREIRA, A. A.; ARAÚJO, L. F.; GARCIA NETO, M.; PINTO, M. F. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n.12, p.2394-2400, 2009.

KABIR, S. M. L.; RAHMAN, M. B.; RAHMAN, M. M.; AHMED, S. U. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.3, n.5, p.361-364, 2004.

KAMEL, C. Extractos de plantas naturais: Remédios clássicos que aportam soluciones modernas a la producción animal. In: **III Conferencia-Salón de Fabricantes de Piensos del Mediterráneo**, Reus (Tarragona), 2000.

- KAMEL, C. Use of plants extracts in European pigs diets. **Feed Compounder**, London, v.19, p.23-27, 1999.
- KATSCHINSKI, M. Nutritional implications of cephalic phase gastrointestinal responses. **Appetite**, Paris, v.34, p.189-196, 2000.
- KAUNITZ, J. D.; AKIBA, Y. Integrated duodenal protective response to acid. **Life Science**, Davis, v.69. p:3073-3081, 2001.
- KLANHEAMMER, T. R. Microbiological considerations in selection and preparation Lactobacillus strain for use as dietary adjuncts. **Journal Dairy Science**, Wisconsin, v.65, n.7, p.1339-1349, 1982.
- KOENEN, M. E.; KRAMER, J.; VAN DER HULST, R.; HERES, L.; JEURISSEN, S. H.; BOERSMA, W. J. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. **British Poultry Science**, Cambridge, v.45, p.355-366, 2004.
- KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. **Microbiology Aliments Nutrition**, Oxford, v.4, p.121-135, 1986.
- LANGHOUT, D. J.; SCHUTTE, J. B.; VAN LEEUWEN, P.; WIEBENGA, J.; TAMMINGA, S. Effect of high and low methyled citrus pectin on activity of the ileal and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. **British Poultry Science**, Cambridge, v.40, p.340-347, 1999.
- LARRONDO, J. V.; AGUT, M.; CALVO-TORRA, M. A. Antimicrobial activity of essences from labiates. **Microbios**, Califórnia, v.82, p.171-172, 1995.
- LAUGERETTE, F.; PASSILLY-DEGRACE, P.; PATRIS, B.; NIOT, I.; FEBRAIO, M.; MONTMAYEUR, J. P.; BESNARD, P. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.115, p.3177-3184, 2005.
- LEE, K. W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H. J.; FREHNER, 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**, Cambridge, v.44, p.450-457, 2003.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.) **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, p.222-241, 1995.
- LEWIS, M. R.; ROSE, S. P.; MCKENZIE, A. M.; TUCKER, A. L. Effects dietary inclusion of plant extracts on the growth performance of male broiler chickens. **British Poultry Science**, Cambridge, v.44(S), p.42-43, 2003.
- LILLY, D. M.; STILLWEL, R. H. Probiotics grow promoting factors produced by

- microorganisms. **Science**, Washigton, v.147, p.747-748, 1965.
- LODDI, M. M.; GONZALES, E.; TAKITA, T. S.; MENDES, A. A.; ROÇA, R. O. Uso de Probiótico e Antibiótico sobre o Desempenho, o Rendimento e a Qualidade de Carcaça de Frangos de Corte1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.4, p.1124-1131, 2000.
- MACARI, M. Fisiologia do Sistema Digestivo das Aves (I). **Aves e Ovos**, v.15, n.8/9, 2-20 p, 1999. 2-20 p. 1999.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.62, p.1017-1023, 1999.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essencial oils from *Lamiacea* and *Compositae* with common food additives. **International Journal Food Science & Technology**, Amsterdam, v.67, p.187-195, 2001.
- MASON, J. R.; BEAN, N. J.; SHAN,P. S.; CLARK, L. Taxon-specific differences in responsiveness to capsaicin and several analogues: correlates between chemical structure and behavioral aversiveness. **Journal Chemical Ecology**, London, v.17, p.2539-2551, 1991.
- MATHLOUTHI, N.; MALLETS, S.; SAULNIER, L.; QUEMENER, B.; LARBIER, M. Effects of xylanase and β -glucanase addition on performance, nutrient digestibility, and phisico-chemical conditions in the small intestine contents and caecal microflora of diet. **Animal Research**, Les Ulis, v.51, n.5, p.395-406, 2002.
- MENARD, S.; CANDALH, C.; BAMBOU, J. C.; TERPEND, K.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN. M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. **Gut**, v.53, p.821–828, 2004.
- METCHNIKOFF, E. **Prolong of life**. New York, Putnam, 1907.
- LILLY, D. M.; STILLWEL, R.H. Probiotics grow promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washington, v.147, p.747-748, 1965.
- MITSCH, P.; ZITTERL-EGLSEER, K.; KÖHLER, B.; GABLER, C.; LOSA, R.; ZIMPERNIK, I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestine of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaing, v.83, p.669-675, 2004.
- MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Antibacterial activity of essential oil components. **International Journal of Food microbioly**, Washington, 1992. 16:337-342.

- MOREY, A.; CANNILAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Boston, v.13, p.:289-292, 2002.
- MOUNTZOURIS, K. C.; BALASKAS, C.; XANTHAKOS, I.; TZIVINIKOU, A; FEGEROS, K. Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. **British Poultry Science**, Cambridge, v.50, p.467–478, 2009.
- MOUNTZOURIS, K. C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities. **Poultry Science**, Champaign, v.86, p.309–317, 2007.
- MOUNTZOURIS, K. C.; TSITRSIKOS, P.; PALAMIDI, I.; ARVANITI, A.; MOHNL, M.; SCHATZMAYAR, G.; FEGEROS, K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. **Poultry Science**, Champaign, v.89, p.58-67, 2010.
- MOURÃO, J. L. T. A. M.; PINHEIRO, V. M. C. Efeitos do centeio, do trigo e da suplementação com xilanases sobre o valor nutricional de dietas e o desempenho de frangos corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n.12, p.2417-2424, 2009.
- NITSAN, Z., G.; BEN-AVRAHAM, Z.; ZOREF; NIR, I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, Cambridge, v.32, p.515–523, 1991.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.74, p.366–373, 1995.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development in poultry. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v.6, p.344–354, 1997.
- NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, London, v.241, p.210–211, 1973.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.61-66, 2007.
- OLUKOSI, O. A.; COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Age-related in-fluence of a cocktail of xylanase, amylase and protease or phytase individually or in combination in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.86, p.77-86, 2007.
- ORNDORFF, B. W.; NOVAK, C. L.; PIERSON, F. W.; CALDWELL, D. J.;

- McELROY, A. P. Comparison of prophylactic or therapeutic dietary administration of capsaicin for reduction of *Salmonella* in broiler chickens. **Avian Disease**, Jacksonville, v.49, p.527-533, 2005.
- OVIEDO-RONDÓN, E. O.; HUME, M. E; HERNÁNDEZ, C.; CLEMENTE-HERNÁNDEZ, S. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. **Poultry Science**, Champaign, v.85, n.5, p.854-860, 2006.
- PASTER, N.; MENASHEROV, M.; RAVID, U.; JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal Food Protect**, Des Moines, v.58, p.81-85, 1995.
- PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v.82, p.627-631, 2003.
- PELICANO, E. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e Ultra-Estrutura da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte alimentados com Dietas contendo diferentes Probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.98, n.547, p.125-134, 2003.
- PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Digestive stimulant action of spices: A myth or reality? **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v.119, p.167-179, 2004.
- RAVINDRAN, V.; WU, Y. B.; THOMAS, D. G.; MOREL, P. C. H. Influence of whole wheat feeding on the development of gastrointestinal tract and performance of broiler chickens. **Australian Journal Agriculture Research**, Melbourne, v.57, p.21-26, 2006.
- REBOLÉ, A.; ORTIZ, L. T.; RODRIGUEZ, M. L.; ALZUETA, C.; TREVINO, J.; VELASCO, S. Effects of inulin and enzyme complex, individually or in combination, on growth performance, intestinal microflora, cecal fermentation characteristics, and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat- and barley-based diet. **Poultry Science**, Champaign, v.89, p.276-286, 2010.
- REHMAN, H. U.; VAHJEN, W.; AWAD, W. A.; ZENTEK, J. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, Cambridge, v.61, p.319-335, 2007.
- RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, Champaign, v.8, p.632-699, 2003.

- ROTA, C.; CARRAMINANA, J. J.; BURILLO, J.; HERRERA, A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. **Journal Food Protect**, Des Moines, v.67, p.1252-1256, 2004.
- RUSSO, M.; GALLETTI, G. C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential oil chemical composition of wild population of Italian oregano spice (*Oreganum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) Letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.3741-3746, 1998.
- SCHEUERMANN, G. N.; CUNHA JUNIOR, A. Perspectivas para a utilização de produtos de origem vegetal como aditivos alternativos na alimentação de aves. Disponível:
<http://www.engormi.com/perspectivas_a_utilizacao_produtos_p_artigos_16_AVG.htm> Acesso em: 13/10/2006.
- SCHNEITZ, C. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poultry Science**, Champaign, v.71, p.2125-2128, 1992.
- SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, p.1327-1332, 1996.
- SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, Manchester, v.28, p.405-440, 2004.
- SHAKOURI, M. D.; IJI, P. A.; MIKKELSEN, L. L.; COWIESON, A. J. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.93, 647-658, 2009.
- SHIN, M. S.; HAN, S. K.; JI, A. R.; KIM, K. S.; LEE, W. K. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v.105, p.364-5072, 2008.
- SILVA, E. N. Probióticos e Prebióticos na Alimentação de Aves. In: CONFERENCIA **APINCO** 2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS. Campinas: Anais...Campinas. FACTA,2000. p 242-251.
- SIMON, G. L.; GORBBACH, S. L. Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, Orlando, v.86, p.174-193, 1984.
- SIMS, M. D.; WILLIAMS, P. G.; FREHNER, M.; LOSA, R. Crina Poultry and BMD alleviate the effects of a *Clostridium perfringens* challenge in commercial broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.83, p.1787-1788,

2004.

- SISSONS, J. W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals – a review. **Journal of Science Food Agricultural**, Davis, v.49, n.1, p.1-13, 1989.
- SMIRNOV, A.; PEREZ, R.; AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v.135, p.187–192, 2005.
- SMITH-PALMER, A.; STERWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils essences against five important foodborne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Washington, v.26, p.118-122, 1998.
- SMITS, C.H.M.; ANNISON, G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition-towards a physiologically valid approach to their determination. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.52, p.203–221, 1996.
- SPTING, P. Effects of mannanoligosaccharide on different cecal parameters and on cecal concentrations of enteric pathogens in poultry. 1996. 120 fl. **Dissertação**. ETH Zurich, Switzerland, 1996.
- SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amsterdam, v.47, p.735-748, 2007.
- STEENFELDT, S.; HAMMERSHÙJ, M.; MUÈ LLERTZ, A.; JENSEN, F. J. Enzyme supplementation to wheat-based diets for broilers. 2. Effects on apparent metabolisable energy content and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.75, p.45-64, 1998a.
- STEENFELDT, S.; HAMMERSHÙJ, M.; MUÈ LLERTZ, A.; JENSEN, F.J. Enzyme supplementation to wheat-based diets for broilers. 2. Effects on growth performance and intestinal viscosity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.75, p.45-65, 1998b.
- STEWART, C. S.; CHESSON, A. Making sense of probiotics. **Pig Veterinary Journal**, London, v.31, p.11-33, 1993.
- STROMBECK, D. R.; GUILFORD, W. G. **Small animal gastroenterology**, 2^a ed. London: Wolfe Publ., 1991. 744 p.
- TABAK, M.; ARMON, R.; NEEMAN, I. Cinnamon extracts inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.67, p.269-277, 1999.
- TELLEZ, G. I.; JAEGER, L.; DEAN, I.; CORRIER, C. E.; DELOACH, D. E.; WILLIAMS, J. D.; HARGIS, B. M. Effect of prolonged administration of dietary capsaicin on *Salmonella enteritidis* infection in leghorn chicks. **Avian**

- Disease**, Jacksonville, v.37, p.143-148, 1993.
- TIMMERMAN, H. M.; VELDMAN, A.; VAN DENELSEN E.; ROMBOUTS, F. M.; BEYNEN, A. C. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. **Poultry Science**, Champaign, v.85, p.1383–1388, 2006.
- TOMINAGA, M.; JULIUS, D. Capsaicin receptor in the pain pathway. **Japanese Journal of pharmacology**, Tokyo, p.8320-8324, 2000.
- TUCKER, L. A. Maintaining pultry performance in antibiotic free-diets supplementation with commercial botanical feed ingredients. **In: Proceedings of 7th WPSA Asian Pacific Federation Conference**, Gold Coast, Australia, p. 227-230, 2002.
- ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELLAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applid Environmental microbiology**, Washington, v.68, p.1561-1568, 2002.
- VAN DERWIELEN, P. W.; BIESTERVELD, S.; NOTERMANS, S.; HOFSTRA, H.; URLINGS, B.A.P.; VAN KNAPEN, F. Role of volatile fatty acids in development of the caecal microflora in broiler chickens during growth. **Applid Environmental Microbiology**, Washington, v.66, 2536–2540, 2000.
- VANBELLE, M. Les enzymes probiotiques: Curso Superior de Nutrición y Alimentación Animale, **Instituto Agronômico Mediterráneo de Zaragoza**, Zaragoza, 1992.
- VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, Cambrigde, v.40, n.7, p.543-567, 1990.
- VICENTE, J. L.; LOPEZ, C.; AVILA, E.; MORALES, E.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Effect of dietary natural capsaicin on experimental *Salmonella enteritidis* . **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.6, p.393-393, 2007.
- WANG, Z. R.; QIAO, S. Y.; LU, W. Q.; LI, D. F. Effects of supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of brothers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, Champaign, v.84, p.875-881, 2005.
- WINDISCH, W.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, Bethesda, v.86(S), p.40-48, 2008.
- WYATT, C. L.; BEDFORD, M. R. Uso de enzimas nutricionais para maximizar a

utilização de nutrientes pelo frango de corte em dietas á base de milho: recentes progressos no desenvolvimento e aplicação prática. In: Seminário Técnico FINNFEEDS, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FINNFEEDS, 1998, p.2-12.

ZANELLA, I.; SAKOMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIRDO, A.; PACK, A. N. O. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, Champaign, v.78, 561–568, 1999.

ZHANG, K. Y.; YAN, F.; KEEN, C. A.; WALDROUP, P. W. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. **International Journal of poultry Science**, Faisalabad, v.4, n.9, p.612-619, 2005.

ZHOU, Y.; JIANG, Z.; LV, D.; WANG, T. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. **Poultry Science**, Champaign, v.88, p.316-322, 2009.

4.APÊNDICES

APÊNDICE A – Observações experimentais – Capítulo II 1. Desempenho Zootécnico

Tratamento	21 dias			28 dias		
	G P (g)	C R (g)	CA	G P (g)	CR(g)	CA
Controle	493,64	662,27	1,34	523,00	899,00	1,72
Controle	528,18	709,45	1,34	531,00	930,00	1,75
Controle	494,55	664,82	1,34	523,00	907,00	1,73
Controle	531,82	715,82	1,35	516,00	876,00	1,70
Controle	530,00	709,30	1,34	525,56	883,33	1,68
Probiótico	527,00	727,00	1,38	515,56	917,78	1,78
Probiótico	539,09	744,45	1,38	517,00	874,00	1,69
Probiótico	535,45	739,82	1,38	552,00	936,00	1,70
Probiótico	498,18	698,18	1,40	525,00	909,00	1,73
Probiótico	518,18	718,73	1,39	541,00	924,00	1,71
Óleo Ess	495,45	690,36	1,39	540,00	937,00	1,74
Óleo Ess	469,55	655,00	1,39	501,00	889,00	1,77
Óleo Ess	500,91	698,73	1,39	517,78	899,90	1,74
Óleo Ess	498,18	686,91	1,38	529,00	921,00	1,74
Óleo Ess	499,09	688,27	1,38	523,00	931,30	1,78
Antibiótico	543,64	726,55	1,34	535,00	908,00	1,70
Antibiótico	536,18	723,18	1,35	530,00	899,00	1,70
Antibiótico	542,73	725,18	1,34	518,00	882,00	1,70
Antibiótico	555,00	746,00	1,34	543,33	906,67	1,67
Antibiótico	560,00	744,40	1,33	543,33	924,44	1,70

2.Morfometria Intestinal (μm) Óleo– 21 dias

Tratamento	Comprimento de Vilo	Largura de Vilo	Altura de Cripta	Nº de Vilos/área	Vilo:Cripta
Controle	694,13	97,21	160,22	6,86	4,33
Controle	677,14	165,61	160,40	5,29	4,22
Controle	802,21	167,02	208,80	4,12	3,84
Controle	612,67	79,82	165,18	9,61	3,71
Controle	864,85	132,15	181,63	5,88	4,76
Probiótico	682,62	66,23	170,22	9,22	4,01
Probiótico	649,30	125,73	179,09	5,69	3,63
Probiótico	883,04	167,51	202,03	4,90	4,37
Probiótico	649,79	110,24	166,77	7,06	3,90
Probiótico	805,11	175,43	171,59	5,49	4,69
Óleo essencial	619,56	125,06	165,48	4,51	3,74
Óleo essencial	784,35	70,64	179,92	10,59	4,36
Óleo essencial	853,25	104,44	166,76	7,25	5,12
Óleo essencial	636,71	129,66	168,51	7,65	3,78
Óleo essencial	749,78	164,21	196,84	5,29	3,81
Antibiótico	857,22	134,26	157,37	5,69	5,45
Antibiótico	848,73	86,74	143,70	4,90	5,91
Antibiótico	863,41	198,81	157,00	5,10	5,50
Antibiótico	741,64	202,71	152,09	0,00	4,88
Antibiótico	760,26	162,96	148,99	5,49	5,10

3. Morfometria Intestinal (μm) íleo – 28 dias

Tratamento	Comprimento de Vilo	Largura de Vilo	Altura de Cripta	Nº de Vilos/área	Vilo:Cripta
Controle	1000,85	141,82	305,50	5,29	3,28
Controle	1051,25	103,78	275,95	7,84	3,81
Controle	1038,11	108,12	279,52	6,08	3,71
Controle	1091,97	154,87	284,20	4,31	3,84
Controle	896,96	200,73	271,62	4,71	3,30
Probiótico	1059,53	155,59	304,58	5,29	3,48
Probiótico	872,26	134,01	275,84	3,92	3,16
Probiótico	1091,43	133,92	286,33	6,47	3,81
Probiótico	991,67	130,62	275,95	4,71	3,59
Probiótico	1093,04	154,74	287,32	5,10	3,80
Óleo essencial	836,42	195,68	304,14	5,10	2,75
Óleo essencial	1069,50	191,66	274,12	4,12	3,90
Óleo essencial	1080,26	124,22	298,69	6,86	3,62
Óleo essencial	1006,67	160,27	272,89	5,10	3,69
Óleo essencial	1090,22	135,74	283,33	6,67	3,85
Antibiótico	1071,26	118,60	261,11	6,08	4,10
Antibiótico	1094,64	171,00	267,04	4,90	4,10
Antibiótico	956,55	129,68	236,84	5,29	4,04
Antibiótico	915,82	178,10	208,03	5,29	4,40
Antibiótico	1089,96	165,74	262,59	4,51	4,15

1. Valores médios ranqueados de Escore de Lesão por *Eimeria sp* aos 21 e 28 dias de idade de frangos de corte

Tratamento	<i>Eimeria maxima</i>		<i>Eimeria acervulina</i>	
	21 dias	28 dias	21 dias	28 dias
Controle	1	0	1	1
Controle	2	0	2	0
Controle	2	0	1	1
Controle	0	1	0	0
Controle	1	1	0	0
Probiótico	1	0	2	0
Probiótico	1	1	1	0
Probiótico	2	0	0	1
Probiótico	2	1	0	0
Probiótico	1	0	1	1
Óleo essencial	0	1	1	1
Óleo essencial	1	0	1	0
Óleo essencial	2	1	1	1
Óleo essencial	2	0	0	0
Óleo essencial	1	0	0	0
Antibiótico	2	0	0	1
Antibiótico	0	0	0	0
Antibiótico	0	0	0	0
Antibiótico	0	1	0	1
Antibiótico	1	0	0	0

APÊNDICE B – Observações experimentais – Capítulo III

1. Desempenho Zootécnico

Tratamento		1-21 dias		32-35 dias			
Nível de Energia	Aditivo	GP (g)	CR(g)	C A	G P (g)	C R (g)	C A
Padrão	Controle	934,90	1226,10	1,31	1154,20	2133,90	1,85
Padrão	Controle	979,90	1263,30	1,29	1166,00	2125,80	1,82
Padrão	Controle	918,20	1222,80	1,33	1050,00	1930,70	1,84
Padrão	Controle	940,40	1149,80	1,22	1150,40	2159,30	1,88
Padrão	Controle	910,00	1239,20	1,36	1147,40	2087,50	1,82
Padrão	Enzima	887,80	1233,30	1,39	1125,80	2118,90	1,88
Padrão	Enzima	966,30	1185,80	1,23	1135,60	2091,90	1,84
Padrão	Enzima	974,30	1189,30	1,22	1156,50	2113,30	1,83
Padrão	Enzima	956,00	1235,70	1,29	1144,70	2126,80	1,86
Padrão	Enzima	907,80	1241,30	1,37	1125,30	2042,60	1,82
Padrão	Probiótico	942,00	1183,50	1,26	1158,60	2120,30	1,83
Padrão	Probiótico	960,70	1241,60	1,29	1135,10	2109,30	1,86
Padrão	Probiótico	931,40	1175,20	1,26	1140,80	2100,50	1,84
Padrão	Probiótico	888,00	1197,80	1,35	1147,40	2095,10	1,83
Padrão	Probiótico	992,40	1260,40	1,27	1097,20	2071,20	1,89
Padrão	Enz+Prob	992,80	1188,40	1,20	1178,30	2155,10	1,83
Padrão	Enz+Prob	946,80	1208,20	1,28	1158,50	2171,90	1,87
Padrão	Enz+Prob	905,40	1199,20	1,32	1096,00	1993,30	1,82
Padrão	Enz+Prob	903,40	1218,20	1,35	1170,70	2132,30	1,82
Padrão	Enz+Prob	947,50	1260,20	1,33	1083,50	2041,40	1,88
Baixa	Controle	906,70	1256,40	1,39	1069,20	2031,30	1,90
Baixa	Controle	957,30	1251,30	1,31	1111,40	2130,40	1,92
Baixa	Controle	916,60	1192,00	1,30	1192,10	2206,70	1,85
Baixa	Controle	868,50	1247,80	1,44	1151,10	2157,50	1,87
Baixa	Controle	922,70	1196,30	1,30	1147,20	2170,60	1,89
Baixa	Enzima	918,50	1192,10	1,30	1149,40	2147,30	1,87
Baixa	Enzima	903,70	1294,10	1,43	1127,40	2164,20	1,92
Baixa	Enzima	924,30	1224,50	1,32	1139,90	2165,40	1,90
Baixa	Enzima	937,80	1254,80	1,34	1141,50	2115,40	1,85
Baixa	Enzima	923,10	1244,50	1,35	1100,30	2088,80	1,90
Baixa	Probiótico	928,30	1249,40	1,35	1176,10	2195,80	1,87
Baixa	Probiótico	868,00	1269,50	1,46	1116,70	2109,50	1,89
Baixa	Probiótico	935,60	1207,00	1,29	1132,00	2183,30	1,93
Baixa	Probiótico	932,00	1219,30	1,31	1120,40	2141,50	1,91
Baixa	Probiótico	923,90	1264,60	1,37	1132,20	2172,50	1,92
Baixa	Enz+Prob	920,40	1263,50	1,37	1154,70	2148,80	1,86

Continuação – Observação experimentais – Capítulo III –
Desempenho Zootécnico

Tratamento		1-21 dias			32-35 dias		
Nível de Energia	Aditivo	Ganho Peso (g)	Consumo Ração (g)	Conversão Alimentar	Ganho Peso (g)	Consumo Ração (g)	CA
Baixa	Enz+Prob	925,80	1202,50	1,30	1116,30	2081,50	1,86
Baixa	Enz+Prob	922,10	1225,20	1,33	1107,90	2133,70	1,93
Baixa	Enz+Prob	925,80	1202,50	1,30	1116,30	2081,50	1,86
Baixa	Enz+Prob	922,10	1225,20	1,33	1107,90	2133,70	1,93

1. Morfometria intestinal – Peso Relativo (g) aos 14 dias

Nível de Energia	Aditivo	Peso Vivo das aves	Moela	Intestino Anterior	Íleo	Ceco
Padrão	Controle	500,50	15,88	30,51	13,91	1,78
Padrão	Controle	499,17	14,98	29,86	12,28	2,07
Padrão	Controle	500,83	16,09	29,29	12,60	2,20
Padrão	Controle	498,67	16,13	28,91	13,58	2,08
Padrão	Enzima	498,33	15,86	28,88	12,79	2,01
Padrão	Enzima	499,33	14,87	29,88	13,44	2,33
Padrão	Enzima	500,00	16,02	30,50	12,20	2,10
Padrão	Enzima	500,17	15,90	30,40	12,70	2,16
Padrão	Enzima	498,83	14,99	28,11	13,80	1,92
Padrão	Probiótico	499,33	15,92	30,29	13,09	1,88
Padrão	Probiótico	499,67	14,94	30,40	13,10	2,30
Padrão	Probiótico	498,00	15,37	30,30	12,21	1,84
Padrão	Probiótico	500,33	15,94	29,08	13,05	2,31
Padrão	Probiótico	500,67	15,99	29,60	12,95	1,90
Padrão	Enz+Prob	502,50	16,02	28,60	13,68	2,16
Padrão	Enz+Prob	499,17	16,03	30,29	13,22	2,08
Padrão	Enz+Prob	501,33	15,08	28,60	12,17	2,15
Padrão	Enz+Prob	497,00	16,22	30,87	13,18	2,29
Padrão	Enz+Prob	503,90	16,13	30,03	12,50	1,89
Baixa	Controle	496,67	17,05	31,07	12,08	2,70
Baixa	Controle	500,00	17,86	31,60	13,16	2,70
Baixa	Controle	497,50	16,10	27,46	13,47	2,31
Baixa	Controle	503,17	17,07	29,93	13,12	2,31
Baixa	Controle	500,17	17,21	28,71	13,70	2,30
Baixa	Enzima	499,17	17,07	29,19	12,42	2,30
Baixa	Enzima	501,82	16,36	31,90	12,32	2,09
Baixa	Enzima	500,00	16,08	30,50	12,70	1,90
Baixa	Enzima	500,17	16,09	27,21	14,00	1,96
Baixa	Enzima	495,83	17,95	29,06	13,19	2,10
Baixa	Probiótico	500,50	17,08	30,61	12,39	2,28
Baixa	Probiótico	496,33	16,00	30,22	13,08	2,78
Baixa	Probiótico	499,50	16,62	31,09	13,41	2,52
Baixa	Probiótico	500,33	17,07	28,80	13,11	2,30
Baixa	Probiótico	499,17	17,43	27,49	13,40	2,70
Baixa	Enz+Prob	500,00	16,80	28,70	13,50	2,00
Baixa	Enz+Prob	500,83	16,17	29,51	12,40	1,96
Baixa	Enz+Prob	500,00	17,84	31,10	12,80	2,36
Baixa	Enz+Prob	496,67	16,11	30,26	12,28	1,97
Baixa	Enz+Prob	499,83	17,03	28,89	13,80	2,04

2. Morfometria intestinal – Peso Relativo (g) aos 35 dias

Níveis de Energia	Aditivo	Peso Vivo das aves	Moela	Intestino Anterior	Íleo	Ceco
Padrão	Controle	2325,00	6,58	10,98	5,76	1,35
Padrão	Controle	2295,00	6,75	11,50	6,05	1,24
Padrão	Controle	2313,33	6,48	10,37	6,16	1,32
Padrão	Controle	2315,00	6,48	11,15	6,68	1,36
Padrão	Controle	2288,17	6,58	11,76	6,38	1,29
Padrão	Enzima	2314,00	6,65	10,75	5,87	1,36
Padrão	Enzima	2198,50	6,75	11,74	6,80	1,25
Padrão	Enzima	2342,50	6,62	11,75	5,98	1,34
Padrão	Enzima	2312,00	6,85	11,11	6,57	1,41
Padrão	Enzima	2337,40	6,55	11,49	6,01	1,22
Padrão	Probiótico	2291,00	6,65	11,09	6,05	1,20
Padrão	Probiótico	2312,50	6,32	11,71	6,18	1,36
Padrão	Probiótico	2252,00	6,95	11,18	6,96	1,35
Padrão	Probiótico	2304,00	6,94	11,02	6,18	1,32
Padrão	Probiótico	2345,70	6,39	11,53	5,93	1,27
Padrão	Enz+Prob	2312,50	6,49	10,85	5,97	1,31
Padrão	Enz+Prob	2312,50	6,30	11,25	6,05	1,33
Padrão	Enz+Prob	2289,00	6,85	11,49	6,89	1,29
Padrão	Enz+Prob	2289,00	6,60	10,98	6,25	1,39
Padrão	Enz+Prob	2313,00	6,57	11,90	6,10	1,33
Baixa	Controle	2289,00	6,95	11,45	6,04	1,42
Baixa	Controle	2280,00	6,51	11,76	5,74	1,34
Baixa	Controle	2317,50	6,50	11,76	6,88	1,40
Baixa	Controle	2330,00	6,60	10,67	6,07	1,35
Baixa	Controle	2290,00	6,90	11,11	6,64	1,38
Baixa	Enzima	2325,00	6,90	11,81	6,82	1,44
Baixa	Enzima	2275,00	6,64	11,35	6,22	1,34
Baixa	Enzima	2312,00	6,59	11,35	5,79	1,41
Baixa	Enzima	2308,00	6,51	11,23	6,07	1,36
Baixa	Enzima	2292,50	6,95	10,56	6,22	1,37
Baixa	Probiótico	2295,00	6,60	10,65	6,25	1,42
Baixa	Probiótico	2387,50	6,66	11,19	6,59	1,45
Baixa	Probiótico	1996,67	6,91	10,54	6,20	1,28
Baixa	Probiótico	2392,50	6,52	11,11	5,56	1,36
Baixa	Probiótico	2445,00	6,50	11,80	6,23	1,45
Baixa	Enz+Prob	2330,00	6,90	11,86	5,77	1,39
Baixa	Enz+Prob	2305,00	6,90	11,53	6,76	1,32
Baixa	Enz+Prob	2291,00	6,80	11,27	6,05	1,37
Baixa	Enz+Prob	2300,00	6,51	10,48	6,06	1,37
Baixa	Enz+Prob	2278,50	6,70	11,31	6,63	1,34

3. Mormofometria Intestinal – Comprimento Relativo (cm) aos 14 dias

Nível de Energia	Aditivo	Peso Vivo das aves (g)	Intestino Anterior	Íleo	Ceco
Padrão	Controle	500,50	156,96	101,58	21,08
Padrão	Controle	496,67	160,19	113,72	18,79
Padrão	Controle	499,17	161,45	110,94	18,13
Padrão	Controle	500,83	150,47	107,76	18,61
Padrão	Controle	498,67	159,56	114,99	18,89
Padrão	Enzima	498,33	160,70	102,96	20,35
Padrão	Enzima	499,33	151,90	106,82	18,42
Padrão	Enzima	500,00	157,06	108,90	18,56
Padrão	Enzima	500,17	153,65	114,88	18,69
Padrão	Enzima	498,83	157,25	111,06	18,64
Padrão	Pro biótico	499,33	161,54	102,82	18,58
Padrão	Pro biótico	499,67	156,20	111,81	18,51
Padrão	Pro biótico	498,00	158,90	115,34	20,48
Padrão	Pro biótico	500,33	151,58	108,29	18,59
Padrão	Pro biótico	500,67	158,79	112,85	18,87
Padrão	Enz+Prob	502,50	164,06	106,69	20,42
Padrão	Enz+Prob	499,17	158,34	115,85	18,79
Padrão	Enz+Prob	501,33	157,54	109,53	18,45
Padrão	Enz+Prob	497,00	148,85	106,86	18,91
Padrão	Enz+Prob	503,90	150,66	109,98	18,75
Baixa	Controle	496,67	160,17	117,10	21,20
Baixa	Controle	500,00	147,40	107,90	20,10
Baixa	Controle	497,50	157,91	117,37	19,70
Baixa	Controle	503,17	157,76	108,75	21,66
Baixa	Controle	500,17	160,49	103,88	21,89
Baixa	Enzima	499,17	161,95	115,95	18,43
Baixa	Enzima	501,82	156,93	116,18	20,17
Baixa	Enzima	500,00	150,80	101,24	19,86
Baixa	Enzima	500,17	146,19	108,88	18,19
Baixa	Enzima	495,83	161,45	105,18	18,55
Baixa	Pro biótico	500,50	158,78	109,27	21,98
Baixa	Pro biótico	496,33	153,12	116,15	20,79
Baixa	Pro biótico	499,50	163,36	101,44	21,50
Baixa	Pro biótico	500,33	149,58	106,99	19,99
Baixa	Pro biótico	499,17	162,35	116,45	21,40
Baixa	Enz+Prob	500,00	161,20	116,00	18,80
Baixa	Enz+Prob	500,83	155,66	116,25	19,07
Baixa	Enz+Prob	500,00	151,80	103,34	20,60
Baixa	Enz+Prob	496,67	154,03	105,02	18,89
Baixa	Enz+Prob	499,83	156,91	107,92	18,61

4. Intestinal – Comprimento Relativo (cm) aos 35 dias

Nível de Energia	Aditivo	Peso Vivo das aves				
		(g)	Moela	Intestino Anterior	Íleo	Ceco
Padrão	Controle	2325,00	42,74	34,21	5,81	42,74
Padrão	Controle	2295,00	39,15	33,79	5,27	39,15
Padrão	Controle	2313,33	39,57	33,78	5,84	39,57
Padrão	Controle	2315,00	41,57	34,57	6,18	41,57
Padrão	Controle	2288,17	39,18	33,02	5,86	39,18
Padrão	Enzima	2314,00	39,22	34,59	5,75	39,22
Padrão	Enzima	2198,50	39,75	34,29	5,59	39,75
Padrão	Enzima	2342,50	38,92	34,55	5,84	38,92
Padrão	Enzima	2312,00	41,00	34,75	5,96	41,00
Padrão	Enzima	2337,40	38,53	33,74	5,65	38,53
Padrão	Probiótico	2291,00	38,48	34,43	5,46	38,48
Padrão	Probiótico	2312,50	39,52	34,64	6,01	39,52
Padrão	Probiótico	2252,00	39,45	33,62	5,60	39,45
Padrão	Probiótico	2304,00	40,95	34,45	6,03	40,95
Padrão	Probiótico	2345,70	40,76	33,91	5,88	40,76
Padrão	Enz+Prob	2312,50	40,61	33,77	5,89	40,61
Padrão	Enz+Prob	2312,50	39,17	34,47	5,83	39,17
Padrão	Enz+Prob	2289,00	38,29	33,27	5,64	38,29
Padrão	Enz+Prob	2289,00	38,75	32,87	5,37	38,75
Padrão	Enz+Prob	2313,00	38,68	34,94	5,71	38,68
Baixa	Controle	2289,00	39,41	34,42	5,81	39,41
Baixa	Controle	2280,00	41,30	33,36	6,01	41,30
Baixa	Controle	2317,50	42,84	34,66	6,21	42,84
Baixa	Controle	2330,00	42,19	34,94	6,05	42,19
Baixa	Controle	2290,00	38,84	34,52	6,16	38,84
Baixa	Enzima	2325,00	38,84	34,65	6,11	38,84
Baixa	Enzima	2275,00	42,50	33,23	5,71	42,50
Baixa	Enzima	2312,00	40,44	34,19	5,99	40,44
Baixa	Enzima	2308,00	38,28	33,87	5,87	38,28
Baixa	Enzima	2292,50	38,86	33,84	5,74	38,86
Baixa	Probiótico	2295,00	38,54	32,83	5,97	38,54
Baixa	Probiótico	2387,50	41,19	33,81	5,90	41,19
Baixa	Probiótico	1996,67	41,87	37,30	6,46	41,87
Baixa	Probiótico	2392,50	40,90	33,71	5,64	40,90
Baixa	Probiótico	2445,00	40,97	32,93	6,53	40,97
Baixa	Enz+Prob	2330,00	40,85	34,70	6,03	40,85
Baixa	Enz+Prob	2305,00	40,43	34,20	6,01	40,43
Baixa	Enz+Prob	2291,00	38,85	32,77	5,86	38,85
Baixa	Enz+Prob	2300,00	40,35	34,73	5,85	40,35
Baixa	Enz+Prob	2278,50	38,13	33,43	5,79	38,13

3. pH do conteúdo do trato gastrointestinal

Nível de Energia	Aditivo	pH 14 dias			pH 35 dias		
		Moela	Íleo	Ceco	Moela	Íleo	Ceco
Padrão	Controle	3,78	6,75	6,15	3,85	7,11	6,30
Padrão	Controle	3,75	6,78	6,15	3,79	7,00	6,22
Padrão	Controle	3,68	6,76	6,16	3,82	6,98	6,33
Padrão	Controle	3,78	6,87	5,97	3,73	7,08	6,14
Padrão	Controle	3,73	6,85	5,98	3,70	6,97	6,34
Padrão	Enzima	3,76	6,80	6,16	3,78	7,12	6,33
Padrão	Enzima	3,75	6,78	6,18	3,81	7,10	6,34
Padrão	Enzima	3,69	6,87	6,00	3,86	6,96	6,17
Padrão	Enzima	3,77	6,76	6,00	3,78	6,96	6,17
Padrão	Enzima	3,78	6,77	5,98	3,81	7,00	6,24
Padrão	Probiótico	3,66	6,87	6,20	3,85	7,10	6,17
Padrão	Probiótico	3,67	6,78	5,98	3,79	6,94	6,15
Padrão	Probiótico	3,75	6,73	6,16	3,75	7,06	6,33
Padrão	Probiótico	3,77	6,75	6,15	3,86	6,97	6,12
Padrão	Probiótico	3,78	6,80	6,07	3,85	7,00	6,24
Padrão	Enz+Prob	3,88	6,78	6,20	3,85	7,11	6,24
Padrão	Enz+Prob	3,70	6,85	6,15	3,79	7,08	6,32
Padrão	Enz+Prob	3,74	6,86	6,16	3,78	7,05	6,33
Padrão	Enz+Prob	3,70	6,80	6,00	3,83	6,98	6,12
Padrão	Enz+Prob	3,75	6,85	5,98	3,70	6,97	6,10
Baixa	Controle	3,33	6,80	5,78	3,89	7,10	6,16
Baixa	Controle	3,30	6,77	5,95	3,76	7,05	6,33
Baixa	Controle	3,28	6,76	5,96	3,74	6,98	6,34
Baixa	Controle	3,13	6,88	5,75	3,79	7,08	6,25
Baixa	Controle	3,25	6,79	5,75	3,71	7,10	6,33
Baixa	Enzima	3,31	6,86	5,90	3,87	7,05	6,27
Baixa	Enzima	3,19	6,78	5,95	3,85	7,00	6,22
Baixa	Enzima	3,32	6,75	5,95	3,78	7,10	6,32
Baixa	Enzima	3,32	6,87	5,75	3,78	6,90	6,12
Baixa	Enzima	3,33	6,88	5,95	3,79	7,05	6,32
Baixa	Probiótico	3,27	6,75	5,80	3,83	6,95	6,17
Baixa	Probiótico	3,32	6,78	5,90	3,78	7,05	6,27
Baixa	Probiótico	3,30	6,83	5,79	3,86	6,94	6,16
Baixa	Probiótico	3,28	6,75	5,90	3,84	7,05	6,10
Baixa	Probiótico	3,33	6,85	5,95	3,90	7,00	6,32
Baixa	Enz+Prob	3,33	6,78	5,97	3,79	7,12	6,34
Baixa	Enz+Prob	3,16	6,85	5,95	3,82	7,10	6,32
Baixa	Enz+Prob	3,32	6,75	5,77	3,78	6,92	6,14
Baixa	Enz+Prob	3,29	6,86	5,90	3,85	6,95	6,17
Baixa	Enz+Prob	3,30	6,85	5,95	3,70	7,10	6,32

APÊNDICE C – Observações experimentais – Capítulo IV
1. Metabolizabilidade de parâmetros de dietas de frango (11-14 e 32-

35 dias)

Nível de Energia	Aditivo	Metaboliz. MS%	Metaboliz. EB%	Metaboliz. PB%	EMA MS Kcal
Padrão	Controle	73,57	76,2	67,03	3227
Padrão	Controle	74,42	78,01	66,91	3304
Padrão	Controle	73,73	76,94	67,1	3258
Padrão	Controle	74,13	77,42	66,83	3279
Padrão	Controle	74,47	77,37	67,42	3276
Padrão	Enzima	74,73	77,48	68,34	3281
Padrão	Enzima	73,31	76,15	66,93	3225
Padrão	Enzima	73,57	77,09	66,18	3265
Padrão	Enzima	74,34	77,07	67,25	3264
Padrão	Enzima	74,24	77,51	67,07	3282
Padrão	Probiótico	74,72	77,55	67,61	3284
Padrão	Probiótico	72,99	76,32	66,47	3232
Padrão	Probiótico	74,43	77,6	67,45	3286
Padrão	Probiótico	73,87	76,74	67,73	3249
Padrão	Probiótico	74,01	77,26	67,05	3272
Padrão	Enz+Prob	73,82	76,7	66,54	3248
Padrão	Enz+Prob	73,56	76,52	66,54	3240
Padrão	Enz+Prob	74,81	77,89	68,03	3299
Padrão	Enz+Prob	74,34	77,77	67,43	3293
Padrão	Enz+Prob	73,57	76,2	67,03	3227
Baixa	Controle	69,29	72,01	64	3000
Baixa	Controle	70,35	72,91	64,23	3037
Baixa	Controle	69,25	72,48	64,32	3020
Baixa	Controle	70,22	73,26	65,16	3052
Baixa	Controle	69,81	72,37	64,85	3015
Baixa	Enzima	70,78	73,74	65,97	3071
Baixa	Enzima	72,31	75,63	67,47	3149
Baixa	Enzima	71,91	74,42	66,62	3099
Baixa	Enzima	70,53	73,5	64,86	3061
Baixa	Enzima	71,6	74,26	66,77	3093
Baixa	Probiótico	68,88	70,92	63,43	2955
Baixa	Probiótico	69,75	71,93	64,35	2996
Baixa	Probiótico	69,99	72,75	63,22	3030
Baixa	Probiótico	70,63	73,43	65,1	3058
Baixa	Probiótico	69,52	72,48	63,86	3019
Baixa	Enz+Prob	72,2	74,97	67,32	3122
Baixa	Enz+Prob	72,59	75,07	67,07	3126
Baixa	Enz+Prob	71,57	74,24	66,97	3092
Baixa	Enz+Prob	71,25	74,07	65,87	3085
Baixa	Enz+Prob	70,47	74,2	65,36	3091

2. Metabolizabilidade de parâmetros de dietas de frangos (32-35 dias)

Nível de Energia	Aditivo	Metaboliz. MS%	Metaboliz. EB%	Metaboliz. PB%	EMA MS Kcal
Padrão	Controle	76,19	80,21	71,79	3541
Padrão	Controle	77,3	81,12	73,52	3583
Padrão	Controle	77,21	81,16	72,66	3585
Padrão	Controle	75,95	79,97	72,20	3530
Padrão	Controle	77,17	80,99	73,57	3577
Padrão	Enzima	77,31	80,65	72,15	3562
Padrão	Enzima	77,24	80,28	72,82	3546
Padrão	Enzima	77,19	80,3	73,20	3546
Padrão	Enzima	77,27	80,69	73,73	3563
Padrão	Enzima	76,14	79,4	71,60	3505
Padrão	Probiótico	77,52	81,02	74,44	3579
Padrão	Probiótico	76,07	79,78	68,92	3522
Padrão	Probiótico	77,36	80,24	73,05	3544
Padrão	Probiótico	76,99	80,31	72,94	3546
Padrão	Probiótico	76,05	79,71	73,16	3518
Padrão	Enz+Prob	77,04	80,81	73,86	3569
Padrão	Enz+Prob	76,24	79,35	71,73	3502
Padrão	Enz+Prob	76	79,61	70,33	3514
Padrão	Enz+Prob	77,32	81,06	72,97	3580
Padrão	Enz+Prob	77,36	80,27	72,87	3545
Baixa	Controle	72	75,45	67,66	3317
Baixa	Controle	73,18	76,56	68,99	3372
Baixa	Controle	72,35	75,69	68,43	3328
Baixa	Controle	72,94	75,33	68,81	3313
Baixa	Controle	74,19	77,39	70,61	3406
Baixa	Enzima	73,18	76,47	70,15	3369
Baixa	Enzima	72,35	75,6	68,23	3328
Baixa	Enzima	73,35	76,32	71,65	3362
Baixa	Enzima	73,74	77,13	71,87	3390
Baixa	Enzima	72,72	75,87	69,38	3337
Baixa	Probiótico	73,36	76,18	68,80	3351
Baixa	Probiótico	72,82	76,18	68,29	3346
Baixa	Probiótico	72,43	75,41	69,04	3316
Baixa	Probiótico	72,93	76,25	69,06	3354
Baixa	Probiótico	73,21	76,24	68,88	3354
Baixa	Enz+Prob	72,96	75,43	68,93	3322
Baixa	Enz+Prob	72,58	76,29	70,64	3355
Baixa	Enz+Prob	73,16	76,26	70,33	3355
Baixa	Enz+Prob	72,84	76,1	70,64	3347
Baixa	Enz+Prob	73,68	77,29	71,09	3411

3. Digestibilidade de parâmetros de dietas de frangos aos 35 dias

Nível de Energia	Aditivo	Digestibilidade MS%	Digestibilidade PB%	EMA MS kcal
Padrão	Controle	73,77	3360	69,82
Padrão	Controle	74,33	3440	71,32
Padrão	Controle	74,54	3442	71,3
Padrão	Controle	74,86	3435	72,2
Padrão	Enzima	74,46	3472	71,59
Padrão	Enzima	73,91	3413	70,12
Padrão	Enzima	74,29	3478	71,59
Padrão	Enzima	74,71	3442	71,54
Padrão	Enzima	73,63	3404	70,99
Padrão	Probiótico	74,36	3427	72,16
Padrão	Probiótico	74,48	3431	70,71
Padrão	Probiótico	74,15	3394	71,95
Padrão	Probiótico	73,79	3468	70,59
Padrão	Probiótico	74,15	3440	70,43
Padrão	Enz+Prob	74,68	3424	71,6
Padrão	Enz+Prob	74,45	3434	71,7
Padrão	Enz+Prob	74,74	3455	71,71
Padrão	Enz+Prob	73,81	3370	71,15
Padrão	Enz+Prob	74,44	3461	70,55
Baixa	Controle	74,52	3434	72,05
Baixa	Controle	73,37	3270	70,77
Baixa	Controle	73,67	3320	69,72
Baixa	Controle	73,52	3312	69,71
Baixa	Controle	74,47	3346	70,02
Baixa	Enzima	73,56	3312	70,65
Baixa	Enzima	73,55	3301	70,17
Baixa	Enzima	74,81	3335	70,63
Baixa	Enzima	73,12	3304	68,93
Baixa	Enzima	74,02	3354	71,31
Baixa	Probiótico	73,53	3298	69,08
Baixa	Probiótico	73,89	3357	70,84
Baixa	Probiótico	73,3	3299	69,89
Baixa	Probiótico	73,52	3296	69,33
Baixa	Probiótico	74,53	3332	70,92
Baixa	Enz+Prob	73,93	3312	69,84
Baixa	Enz+Prob	73,51	3300	69,49
Baixa	Enz+Prob	74,67	3329	71,46
Baixa	Enz+Prob	73,27	3307	68,87
Baixa	Enz+Prob	73,57	3285	70,96

3. Produção de resíduos (g) de frango dos 11 aos 14 dias

Nível de Energia	Aditivo	Produção Dejeito MN	Produção dejeito MS	Excreção de H2O	Coefficiente Resíduo (g/g)	Excreção N2
Padrão	Controle	183,18	49,5	133,68	0,32	0,8318
Padrão	Controle	180,07	48,77	131,3	0,32	0,7845
Padrão	Controle	174,06	47,54	126,52	0,32	0,7880
Padrão	Controle	177,32	47,94	129,37	0,32	0,7838
Padrão	Controle	178,55	48,17	130,37	0,32	0,8000
Padrão	Enzima	171,73	46,3	125,44	0,3	0,7767
Padrão	Enzima	175,14	47,17	127,97	0,31	0,7617
Padrão	Enzima	181,44	49,45	131,99	0,33	0,7796
Padrão	Enzima	178,44	49,35	129,09	0,32	0,8015
Padrão	Enzima	172,47	47,03	125,45	0,31	0,7840
Padrão	Probiótico	178	48,08	129,92	0,31	0,7918
Padrão	Probiótico	172,14	47,03	125,11	0,31	0,7688
Padrão	Probiótico	182,85	49,43	133,43	0,32	0,8005
Padrão	Probiótico	175,42	47,42	128	0,31	0,7789
Padrão	Probiótico	178,9	48,43	130,46	0,33	0,7707
Padrão	Enz+Prob	177,38	48,01	129,36	0,32	0,7793
Padrão	Enz+Prob	179,83	48,55	131,28	0,33	0,7989
Padrão	Enz+Prob	180,01	49,31	130,7	0,33	0,7897
Padrão	Enz+Prob	171,62	46,23	125,39	0,3	0,7660
Padrão	Enz+Prob	175,97	47,64	128,33	0,32	0,7728
Baixa	Controle	225,13	57,25	167,88	0,38	0,8851
Baixa	Controle	222,03	56,64	165,39	0,38	0,9014
Baixa	Controle	226,67	58,16	168,51	0,39	0,8903
Baixa	Controle	220,43	56,86	163,57	0,37	0,8776
Baixa	Controle	227,03	57,69	169,34	0,39	0,8861
Baixa	Enzima	221,15	53,92	167,22	0,35	0,8095
Baixa	Enzima	216,21	52	164,21	0,35	0,7873
Baixa	Enzima	217,25	53	164,25	0,36	0,8115
Baixa	Enzima	214,89	54,83	160,05	0,37	0,8428
Baixa	Enzima	220,74	53,5	167,24	0,35	0,8069
Baixa	Probiótico	226,27	58,62	167,65	0,39	0,9104
Baixa	Probiótico	224,01	57,6	166,41	0,39	0,8971
Baixa	Probiótico	217,92	56,15	161,77	0,37	0,9095
Baixa	Probiótico	218,03	55,67	162,37	0,37	0,8740
Baixa	Probiótico	223,16	58,32	164,85	0,39	0,9138
Baixa	Enz+Prob	221,67	52,42	169,25	0,35	0,8026
Baixa	Enz+Prob	219,39	51,8	167,59	0,34	0,8106
Baixa	Enz+Prob	221,43	53,03	168,39	0,36	0,8023
Baixa	Enz+Prob	214,17	53,5	160,66	0,36	0,8271
Baixa	Enz+Prob	225,95	55,84	170,11	0,37	0,8533

5. Produção de resíduos (g) de frango dos 32 aos 35 dias

Nível de Energia	Aditivo	Produção Dejeito MN	Produção dejeito MS	Excreção de H ₂ O	Coefic Resíduo (g/g)	Excreção N ₂
Padrão	Controle	414,63	104,91	309,71	0,42	1,434
Padrão	Controle	405,51	100,97	304,54	0,4	1,358
Padrão	Controle	406,3	101,35	304,95	0,41	1,403
Padrão	Controle	422,5	104,01	318,49	0,42	1,386
Padrão	Controle	401,75	102,81	309,42	0,4	1,338
Padrão	Enzima	406,25	99,43	306,82	0,39	1,376
Padrão	Enzima	407,5	100,8	306,7	0,41	1,355
Padrão	Enzima	413	100,24	312,76	0,4	1,326
Padrão	Enzima	411,31	99,97	311,34	0,4	1,299
Padrão	Enzima	405,99	100,65	309,41	0,42	1,411
Padrão	Probiótico	396,17	98,74	297,42	0,4	1,293
Padrão	Probiótico	414,9	105,67	309,23	0,42	1,589
Padrão	Probiótico	419,75	99,41	320,34	0,39	1,365
Padrão	Probiótico	414,75	101,42	313,33	0,4	1,376
Padrão	Probiótico	423,1	101,09	309,95	0,43	1,370
Padrão	Enz+Prob	406,75	101,39	305,36	0,4	1,336
Padrão	Enz+Prob	407,45	104,39	303,06	0,42	1,440
Padrão	Enz+Prob	408,1	105,51	302,59	0,42	1,514
Padrão	Enz+Prob	419,38	100,55	318,82	0,4	1,389
Padrão	Enz+Prob	405,46	99,82	305,64	0,4	1,388
Baixa	Controle	518,13	127,54	390,59	0,5	1,695
Baixa	Controle	520	121,73	398,27	0,48	1,626
Baixa	Controle	529,32	126,52	402,81	0,5	1,661
Baixa	Controle	512,5	124,06	388,44	0,49	1,646
Baixa	Controle	492,13	117,83	374,29	0,46	1,543
Baixa	Enzima	526,86	121,68	405,18	0,48	1,595
Baixa	Enzima	490,38	125,59	364,78	0,49	1,700
Baixa	Enzima	512,88	121,66	391,21	0,48	1,520
Baixa	Enzima	521,3	120,41	400,89	0,47	1,503
Baixa	Enzima	525,66	124,25	401,41	0,49	1,635
Baixa	Probiótico	514,31	121,52	392,79	0,48	1,639
Baixa	Probiótico	530,87	124,58	406,29	0,49	1,667
Baixa	Probiótico	515	125,28	389,72	0,49	1,618
Baixa	Probiótico	515,91	123,73	392,18	0,49	1,627
Baixa	Probiótico	520,62	122,1	398,52	0,48	1,634
Baixa	Enz+Prob	515,29	122,95	392,34	0,48	1,658
Baixa	Enz+Prob	511,25	124,81	386,44	0,5	1,558
Baixa	Enz+Prob	523	123,25	399,75	0,48	1,590
Baixa	Enz+Prob	523,94	123,43	400,5	0,49	1,556
Baixa	Enz+Prob	495,08	119,37	375,71	0,47	1,546

APÊNDICE D – Protocolos experimentais – Capítulo V

Protocolos de extração do DNA

Kit Quiagen

1. Pesar 200 mg de amostra e adicionar o tampão de lise (1,4 mL) e fazer vórtex por 1' para homogeneizar
2. Incubar a amostra por 95 °C
3. Fazer vórtex por 15'' e centrifugar por 2'
4. Pipetar 1,2 mL do sobrenadante e descartar o pelete
5. Adicionar a pastilha inibidora à amostra e fazer vórtex por 1'. Incubar a suspensão por 1' a temperatura ambiente
6. Centrifugar a amostra por 3'
7. Pipete o sobrenadante em um novo eppendorf de 1,5 mL e descartar o pelete. Centrifugar por mais 3'
8. Pipetar 15 µL de proteinase k dentro de um novo eppendorf de 1,5 mL
9. Pipetar 200 µL do sobrenadante do passo 7 e colocar dentro do eppendorf com proteinase k
10. Adicionar 200 µL do tampão AL e proceder ao vórtex por 15''
11. Incubar a 95 °C por 10'
12. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%) e homogeneizar por vórtex
13. Transferir o conteúdo do item 12 dentro da coluna Spin QIAamp e centrifugar por 2'
14. Adicionar 500 µL do tampão AW1 e centrifugar por 2'
15. Transferir a coluna para um novo eppendorf e descartar o filtrado
16. Adicionar 500 µL do tampão AW2, centrifugar por 3' e descartar o filtrado
17. Transferir a coluna para um novo eppendorf e centrifugar por 2'
18. Transferir a coluna para um novo eppendorf e adicionar 200 µL do tampão AE dentro da coluna. Incubar por 1' a temperatura ambiente e centrifugar por 2' para eluir o DNA

APÊNDICE D – Análises Estatística – Capítulo I

1. Escore de lesão – Análise não paramétrica

Rank			
Dieta		N	Mean Rank
21dias <i>E. maxima</i>	Controle	5	13,50 ¹
	Probiótico	5	14,75
	Óleo essencial	5	15,75
	Antibiótico	5	12,25
Total		25	

Test statistics ^{b,c}			
<i>E. Maxima 21 dias</i>			
Chi-square		5,278	
df		3	
Asymp. Sig.		.153	
Monte Carlo Sig.		.149	
Sig. 99% Confidence Interval	Lower Bound	.140	
	Upper Bound	.158	

a)Basead on 10000 sampled tables b) Kruskal Wallis Test, c) Grouping Variable: Dieta

Rank			
Dieta		N	Mean Rank
28dias <i>E. maxima</i>	Controle	5	9,0
	Probiótico	5	9,0
	Óleo essencial	5	11,5
	Antibiótico	5	7,75
Total		25	

Test statistics ^{b,c}			
<i>E. Maxima 28 dias</i>			
Chi-square		9.704	
df		3	
Asymp. Sig.		.046	
Monte Carlo Sig.		.036 ^a	
Sig. 99% Confidence Interval	Lower Bound	.031	
	Upper Bound	.040	

a)Basead on 10000 sampled tables b) Kruskal Wallis Test, c) Grouping Variable: Dieta

Rank			
Dieta		N	Mean Rank
21dias <i>E.acervulina</i>	Controle	5	11,25
	Probiótico	5	11,25
	Óleo essencial	5	11,0
	Antibiótico	5	10,25
Total		25	

Test statistics ^{b,c}			
<i>E.acervulina 21 dias</i>			
Chi-square		2.787	
df		3	
Asymp. Sig.		.426	
Monte Carlo Sig.		.672	
Sig. 99% Confidence Interval	Lower Bound	.660	
	Upper Bound	.684	

a)Basead on 10000 sampled tables b) Kruskal Wallis Test, c) Grouping Variable: Dieta

Rank			
Dieta		N	Mean Rank
28dias <i>E. acervulina</i>	Controle	5	9,0
	Probiótico	5	9,0
	Óleo essencial	5	8,0
	Antibiótico	5	8,0
Total		25	

Test statistics ^{b,c}			
<i>E.acervulina</i> 28dias			
Chi-square		2.111	
DF		3	
Asymp. Sig.		.550	
Monte Carlo Sig.		1.000 ^a	
Sig. 99% Confidence Interval	Lower Bound	1.000	
	Upper Bound	1.000	

a) Basead on 10000 sampled tables b) Kruskal Wallis Test, c) Grouping Variable: Dieta

2. Morfometria Intestinal do Íleo aos 21 e 28 dias para o Comprimento de vilo (CV), largura de vilo (LV), Altura de cripta (AC), número de vilo (NV) e relação vilo:cripta

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CV_ íleo21dias	1,118	3	16	,371
LV_ íleo21dias	,294	3	16	,829
AC_ íleo21dias	1,905	3	16	,169
NV_ íleo21dias	,106	3	16	,955
VC_ íleo21dias	,514	3	16	,678

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CV_ íleo 21dias	Between Groups	26084,371	3	8694,790	1,005	,416
	Within Groups	138487,456	16	8655,466		
	Total	164571,827	19			
LV_ íleo 21dias	Between Groups	4095,368	3	1365,123	,774	,526
	Within Groups	28235,762	16	1764,735		
	Total	32331,130	19			
AC_ íleo 21dias	Between Groups	2254,996	3	751,665	3,587	,037
	Within Groups	3352,683	16	209,543		
	Total	5607,679	19			
NV_ íleo 21dias	Between Groups	22,871	3	7,624	1,638	,220
	Within Groups	74,448	16	4,653		
	Total	97,319	19			
VC_ íleo 21dias	Between Groups	5,557	3	1,852	8,667	,001
	Within Groups	3,419	16	,214		
	Total	8,976	19			

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CV_ íleo 28dias	,231	3	16	,873
LV_ íleo 28dias	1,566	3	16	,237
AC_ íleo 28dias	1,971	3	16	,159
NV_ íleo 28dias	1,379	3	16	,285
VC_ íleo 28dias	1,453	3	16	,265

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CV_ íleo 28dias	Between Groups	316,184	3	105,395	,013	,998
	Within Groups	129167,032	16	8072,940		
	Total	129483,216	19			
LV_ íleo 28dias	Between Groups	1360,260	3	453,420	,526	,671
	Within Groups	13804,367	16	862,773		
	Total	15164,627	19			
AC_ íleo 28dias	Between Groups	5505,233	3	1835,078	6,491	,004
	Within Groups	4523,437	16	282,715		
	Total	10028,670	19			
NV_ íleo 28dias	Between Groups	1,070	3	,357	,317	,813
	Within Groups	18,021	16	1,126		
	Total	19,091	19			
VC_ íleo 28dias	Between Groups	1,287	3	,429	4,433	,019
	Within Groups	1,548	16	,097		
	Total	2,835	19			

3. Desempenho Zootécnico**Test of Homogeneity of Variances-Ganho de Peso (GP)14-21 dias**

GP14_21dias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,960	3	16	,161

ANOVA- Ganho de Peso 14-21 dias

GP14_21dias

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7686,655	3	2562,218	11,135	,000
Within Groups	3681,541	16	230,096		
Total	11368,195	19			

Test of Homogeneity of Variances- Consumo de ração (CR) 14-21 dias

CR14_21dias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,690	3	16	,081

ANOVA- Consumo de ração (CR) 14-21 dias

CR14_21dias

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8827,843	3	2942,614	8,153	,002
Within Groups	5774,942	16	360,934		
Total	14602,784	19			

Test of Homogeneity of Variances- Conversão alimentar (CA) 14-21dias

CA14_21dias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,114	3	16	,372

ANOVA - Conversão alimentar 14-21dias

CA14_21dias

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,010	3	,003	75,074	,000
Within Groups	,001	16	,000		
Total	,011	19			

Test of Homogeneity of Variances – Ganho de Peso (GP) 21-28 dias

GP21_28dias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,987	3	16	,157

ANOVA - Ganho de Peso 21-28 dias

GP21_28dias

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	455,493	3	151,831	1,010	,414
Within Groups	2404,231	16	150,264		
Total	2859,724	19			

Test of Homogeneity of Variances – Consumo de ração (CR) 21-28 dias

CR21_28dias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,644	3	16	,219

ANOVA- Consumo de ração 21-28 dias

CR21_28dias

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	974,997	3	324,999	1,101	,377
Within Groups	4721,426	16	295,089		
Total	5696,423	19			

Test of Homogeneity of Variances- Conversão alimentar (CA) 21-28 dias

CA21_28dias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,468	3	16	,261

ANOVA- Conversão alimentar 21-28 dias

CA21_28dias

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,009	3	,003	4,799	,014
Within Groups	,010	16	,001		
Total	,019	19			

APÊNDICE E – Análises Estatística – Capítulo II

1. Desempenho Zootécnico de 1 a 21 e de 22 a 35 dias para as variáveis ganho de peso (GP), Consumo de ração (CR) e Conversão alimentar (CA)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: GP_1a21dias

F	df1	df2	Sig.
1,581	7	32	,177

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: GP_1a21dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4401,733(a)	7	628,819	,713	,662
Intercept	34538271,103	1	34538271,103	39153,801	,000
Energia	4060,830	1	4060,830	4,603	,040
Aditivo	191,749	3	63,916	,072	,974
Energia * Aditivo	149,154	3	49,718	,056	,982
Error	28227,775	32	882,118		
Total	34570900,610	40			
Corrected Total	32629,507	39			

a. R Squared = ,135 (Adjusted R Squared = -,054)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: CR_1a21dias

F	df1	df2	Sig.
,265	7	32	,963

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CR_1a21dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5503,434(a)	7	786,205	,719	,657
Intercept	60203762,397	1	60203762,397	55026,291	,000
Energia	4725,189	1	4725,189	4,319	,046
Aditivo	129,338	3	43,113	,039	,989
Energia * Aditivo	648,907	3	216,302	,198	,897
Error	35010,908	32	1094,091		
Total	60244276,739	40			
Corrected Total	40514,342	39			

a R Squared = ,136 (Adjusted R Squared = -,053)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: CA_1a21dias

F	df1	df2	Sig.
,770	7	32	,616

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CA_1a21dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,026(a)	7	,004	1,111	,380
Intercept	70,066	1	70,066	21192,012	,000
Energia	,024	1	,024	7,262	,011
Aditivo	,000	3	,000	,045	,987
Energia * Aditivo	,001	3	,000	,126	,944
Error	,106	32	,003		
Total	70,198	40			
Corrected Total	,132	39			

a R Squared = ,195 (Adjusted R Squared = ,020)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: GP_21a35dias

F	df1	df2	Sig.
2,065	7	32	,077

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: GP_21a35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	137,897(a)	7	19,700	,018	1,000
Intercept	51527774,207	1	51527774,207	48101,562	,000
Energia	49,107	1	49,107	,046	,832
Aditivo	24,041	3	8,014	,007	,999
Energia * Aditivo	64,750	3	21,583	,020	,996
Error	34279,319	32	1071,229		
Total	51562191,423	40			
Corrected Total	34417,216	39			

a R Squared = ,004 (Adjusted R Squared = -,214)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: CR_21a35dias

F	df1	df2	Sig.
1,946	7	32	,094

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CR_21a35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26216,507(a)	7	3745,215	1,234	,314
Intercept	179867468,432	1	179867468,432	59248,703	,000
Energia	23965,431	1	23965,431	7,894	,008
Aditivo	1494,750	3	498,250	,164	,920
Energia * Aditivo	756,326	3	252,109	,083	,969
Error	97145,738	32	3035,804		
Total	179990830,677	40			
Corrected Total	123362,245	39			

a R Squared = ,213 (Adjusted R Squared = ,040)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: CA_21a35dias

F	df1	df2	Sig.
1,270	7	32	,296

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CA_21a35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,023(a)	7	,003	4,033	,003
Intercept	139,689	1	139,689	172989,551	,000
Energia	,022	1	,022	26,777	,000
Aditivo	,001	3	,000	,399	,754
Energia * Aditivo	,000	3	6,92E-005	,086	,967
Error	,026	32	,001		
Total	139,738	40			
Corrected Total	,049	39			

a R Squared = ,469 (Adjusted R Squared = ,353)

2.Morfometria intestinal – Peso Relativo (g) aos 14e 35 dias**Levene's Test of Equality of Error Variances(a)**

Dependent Variable: Peso_Moela_14dias

F	df1	df2	Sig.
,547	7	32	,793

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_Moela_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14,484(a)	7	2,069	5,562	,000
Intercept	10572,903	1	10572,903	28419,489	,000
Energia	13,995	1	13,995	37,618	,000
Aditivo	,455	3	,152	,407	,749
Energia * Aditivo	,035	3	,012	,031	,992
Error	11,905	32	,372		
Total	10599,292	40			
Corrected Total	26,389	39			

a R Squared = ,549 (Adjusted R Squared = ,450)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Peso_Intestino Anterior_14dias

F	df1	df2	Sig.
1,398	7	32	,240

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_ Intestino Anterior _14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,482(a)	7	,069	,046	1,000
Intercept	35214,136	1	35214,136	23445,846	,000
Energia	,001	1	,001	,001	,977
Aditivo	,107	3	,036	,024	,995
Energia * Aditivo	,374	3	,125	,083	,969
Error	48,062	32	1,502		
Total	35262,680	40			
Corrected Total	48,544	39			

a R Squared = ,010 (Adjusted R Squared = -,207)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Peso_Íleo_14dias

F	df1	df2	Sig.
,571	7	32	,774

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_Íleo_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,141(a)	7	,020	,054	1,000
Intercept	6773,267	1	6773,267	18039,915	,000
Energia	,001	1	,001	,001	,969
Aditivo	,075	3	,025	,067	,977
Energia * Aditivo	,065	3	,022	,058	,981
Error	12,015	32	,375		
Total	6785,422	40			
Corrected Total	12,156	39			

a R Squared = ,012 (Adjusted R Squared = -,205)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Peso_ceco esq_14dias

F	df1	df2	Sig.
,931	7	32	,56

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_ceco esq_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2,204(a)	7	,315	4,247	,002
Intercept	192,809	1	192,809	2600,692	,000
Energia	,734	1	,734	9,906	,004
Aditivo	,746	3	,249	3,353	,031
Energia * Aditivo	,724	3	,241	3,254	,034
Error	2,372	32	,074		
Total	197,385	40			
Corrected Total	4,576	39			

a. R Squared = ,544 (Adjusted R Squared = ,444)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Peso_Moela_35_dias

F	df1	df2	Sig.
1,615	7	32	,167

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_Moela_35_dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,165(a)	7	,024	,644	,716
Intercept	1774,224	1	1774,224	48549,022	,000
Energia	,072	1	,072	1,977	,169
Aditivo	,027	3	,009	,244	,865
Energia * Aditivo	,066	3	,022	,600	,620
Error	1,169	32	,037		
Total	1775,558	40			
Corrected Total	1,334	39			

a. R Squared = ,123 (Adjusted R Squared = -,068)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Peso_IntestinoAnterior_35dias

F	df1	df2	Sig.
,148	7	32	,993

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_IntestinoAnterior_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,382(a)	7	,055	,262	,964
Intercept	5071,279	1	5071,279	24361,823	,000
Energia	,016	1	,016	,079	,781
Aditivo	,101	3	,034	,162	,921
Energia * Aditivo	,265	3	,088	,424	,737
Error	6,661	32	,208		
Total	5078,322	40			
Corrected Total	7,043	39			

a R Squared = ,054 (Adjusted R Squared = -,153)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Peso_ileo_35dias

F	df1	df2	Sig.
,381	7	32	,907

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_ileo_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,043(a)	7	,006	,039	1,000
Intercept	1555,134	1	1555,134	9783,407	,000
Energia	,001	1	,001	,008	,928
Aditivo	,008	3	,003	,017	,997
Energia * Aditivo	,034	3	,011	,070	,975
Error	5,087	32	,159		
Total	1560,264	40			
Corrected Total	5,130	39			

a R Squared = ,008 (Adjusted R Squared = -,208)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Peso_cecoEsq_35dias

F	df1	df2	Sig.
2,130	7	32	,069

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Peso_cecoEsq_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,046(a)	7	,007	2,261	,055
Intercept	72,496	1	72,496	25063,289	,000
Energia	,040	1	,040	13,940	,001
Aditivo	,000	3	6,92E-005	,024	,995
Energia * Aditivo	,005	3	,002	,605	,617
Error	,093	32	,003		
Total	72,634	40			
Corrected Total	,138	39			

a R Squared = ,331 (Adjusted R Squared = ,185)

3. Morfometria intestinal – Comprimento Relativo (cm) aos 14e 35 dias

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Comp_IntestinoAnterior_14dias

F	df1	df2	Sig.
1,096	7	32	,389

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Comp_IntestinoAnterior_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	25,642(a)	7	3,663	,142	,994
Intercept	980782,675	1	980782,675	37961,770	,000
Energia	1,525	1	1,525	,059	,810
Aditivo	22,186	3	7,395	,286	,835
Energia * Aditivo	1,931	3	,644	,025	,995
Error	826,754	32	25,836		
Total	981635,071	40			
Corrected Total	852,396	39			

a R Squared = ,030 (Adjusted R Squared = -,182)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Comp_Íleo_14dias

F	df1	df2	Sig.
,773	7	32	,614

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Comp_Íleo_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12,595(a)	7	1,799	,059	1,000
Intercept	482876,453	1	482876,453	15904,206	,000
Energia	1,455	1	1,455	,048	,828
Aditivo	8,114	3	2,705	,089	,966
Energia * Aditivo	3,026	3	1,009	,033	,992
Error	971,570	32	30,362		
Total	483860,618	40			
Corrected Total	984,165	39			

a R Squared = ,013 (Adjusted R Squared = -,203)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Comp_ceco_14dias

F	df1	df2	Sig.
,295	7	32	,951

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Comp_ceco_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	29,278(a)	7	4,183	5,366	,000
Intercept	15283,799	1	15283,799	19609,447	,000
Energia	10,889	1	10,889	13,971	,001
Aditivo	9,717	3	3,239	4,156	,014
Energia * Aditivo	8,672	3	2,891	3,709	,021
Error	24,941	32	,779		
Total	15338,019	40			
Corrected Total	54,219	39			

a R Squared = ,540 (Adjusted R Squared = ,439)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Comp_InterioAnterior_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,339	7	32	,265

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Comp_InteriorAnterior_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13,722(a)	7	1,960	1,093	,391
Intercept	63989,600	1	63989,600	35686,751	,000
Energia	3,187	1	3,187	1,777	,192
Aditivo	10,110	3	3,370	1,880	,153
Energia * Aditivo	,425	3	,142	,079	,971
Error	57,379	32	1,793		
Total	64060,701	40			
Corrected Total	71,101	39			

a R Squared = ,193 (Adjusted R Squared = ,016)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Comp_ileo_35dias

F	df1	df2	Sig.
2,028	7	32	,082

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Comp_ileo_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,583(a)	7	,226	,296	,951
Intercept	46495,352	1	46495,352	60819,678	,000
Energia	,005	1	,005	,006	,939
Aditivo	,437	3	,146	,190	,902
Energia * Aditivo	1,142	3	,381	,498	,686
Error	24,463	32	,764		
Total	46521,398	40			
Corrected Total	26,046	39			

a R Squared = ,061 (Adjusted R Squared = -,145)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Comp_cecoEsq_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,909	7	32	,101

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Comp_cecoEsg_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,717(a)	7	,102	1,842	,113
Intercept	1379,098	1	1379,098	24795,000	,000
Energia	,513	1	,513	9,224	,005
Aditivo	,162	3	,054	,968	,420
Energia * Aditivo	,043	3	,014	,255	,857
Error	1,780	32	,056		
Total	1381,595	40			
Corrected Total	2,497	39			

a R Squared = ,287 (Adjusted R Squared = ,131)

4.pH do conteúdo do trato gastrointestinal aos 14 e 35 dias

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: pH_Moela_14dias

F	df1	df2	Sig.
,744	7	32	,637

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH_Moela_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2,128(a)	7	,304	91,813	,000
Intercept	493,717	1	493,717	149102,914	,000
Energia	2,121	1	2,121	640,424	,000
Aditivo	,002	3	,001	,242	,866
Energia * Aditivo	,005	3	,002	,514	,675
Error	,106	32	,003		
Total	495,951	40			
Corrected Total	2,234	39			

a R Squared = ,953 (Adjusted R Squared = ,942)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: pH_Íleo_14dias

F	df1	df2	Sig.
,560	7	32	,782

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH_Íleo_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,009(a)	7	,001	,547	,792
Intercept	1853,002	1	1853,002	763730,680	,000
Energia	,000	1	,000	,174	,679
Aditivo	,006	3	,002	,878	,463
Energia * Aditivo	,002	3	,001	,342	,795
Error	,078	32	,002		
Total	1853,088	40			
Corrected Total	,087	39			

a R Squared = ,107 (Adjusted R Squared = -,088)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: pH_Ceco_14dias

F	df1	df2	Sig.
,860	7	32	,548

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH_Ceco_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,465(a)	7	,066	7,884	,000
Intercept	1432,211	1	1432,211	169995,319	,000
Energia	,443	1	,443	52,594	,000
Aditivo	,010	3	,003	,386	,763
Energia * Aditivo	,012	3	,004	,477	,700
Error	,270	32	,008		
Total	1432,945	40			
Corrected Total	,735	39			

a R Squared = ,633 (Adjusted R Squared = ,553)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: pH_Moela_35dias

F	df1	df2	Sig.
,508	7	32	,821

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH_Moela_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,018(a)	7	,003	,922	,503
Intercept	578,284	1	578,284	207642,443	,000
Energia	,000	1	,000	,152	,699
Aditivo	,017	3	,006	1,995	,135
Energia * Aditivo	,001	3	,000	,106	,956
Error	,089	32	,003		
Total	578,391	40			
Corrected Total	,107	39			

a R Squared = ,168 (Adjusted R Squared = -,014)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: pH_Íleo_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,300	7	32	,282

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH_Íleo_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,013(a)	7	,002	,378	,908
Intercept	1975,852	1	1975,852	415968,826	,000
Energia	6,25E-005	1	6,25E-005	,013	,909
Aditivo	,009	3	,003	,624	,605
Energia * Aditivo	,004	3	,001	,255	,858
Error	,152	32	,005		
Total	1976,017	40			
Corrected Total	,165	39			

a R Squared = ,076 (Adjusted R Squared = -,126)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: pH_Ceco_35dias

F	df1	df2	Sig.
,352	7	32	,923

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pH_Ceco_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,030(a)	7	,004	,547	,792
Intercept	1558,378	1	1558,378	198709,305	,000
Energia	,002	1	,002	,232	,633
Aditivo	,026	3	,009	1,111	,359
Energia * Aditivo	,002	3	,001	,088	,966
Error	,251	32	,008		
Total	1558,659	40			
Corrected Total	,281	39			

a R Squared = ,107 (Adjusted R Squared = -,089)

APÊNDICE F – Análise Estatística– Capítulo IV**1. Metabolizabilidade de parâmetros de dietas de frango aos 14 dias****Levene's Test of Equality of Error Variances(a) – Metaboliz. Matéria seca (CMA_MS)**

Dependent Variable: CMA_MS_14dias

F	df1	df2	Sig.
,740	7	32	,640

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CMA_MS_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	132,031(a)	7	18,862	48,783	,000
Intercept	209392,476	1	209392,476	541564,363	,000
Energia	116,554	1	116,554	301,451	,000
Aditivo	8,394	3	2,798	7,236	,001
Energia * Aditivo	7,083	3	2,361	6,106	,002
Error	12,373	32	,387		
Total	209536,879	40			
Corrected Total	144,403	39			

a R Squared = ,914 (Adjusted R Squared = ,896)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)- Metaboliz. Da Energia (CMA_EB)

Dependent Variable: CMA_EB_14dias

F	df1	df2	Sig.
,505	7	32	,824

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CMA_EB_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	156,384(a)	7	22,341	51,601	,000
Intercept	226692,170	1	226692,170	523595,936	,000
Energia	136,826	1	136,826	316,030	,000
Aditivo	9,839	3	3,280	7,575	,001
Energia * Aditivo	9,719	3	3,240	7,483	,001
Error	13,854	32	,433		
Total	226862,408	40			
Corrected Total	170,239	39			

a R Squared = ,919 (Adjusted R Squared = ,901)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a) – Metaboliz. da Protina bruta (CMA_PB)

Dependent Variable: CMA_PB_14dias

F	df1	df2	Sig.
1,312	7	32	,277

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CMA_PB_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	56,433(a)	7	8,062	16,741	,000
Intercept	175440,621	1	175440,621	364317,263	,000
Energia	31,471	1	31,471	65,352	,000
Aditivo	13,130	3	4,377	9,089	,000
Energia * Aditivo	11,832	3	3,944	8,190	,000
Error	15,410	32	,482		
Total	175512,464	40			
Corrected Total	71,842	39			

a R Squared = ,786 (Adjusted R Squared = ,739)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)- Energia metabolizável aparente (EMA)

Dependent Variable: EMA_14dias

F	df1	df2	Sig.
,545	7	32	,794

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EMA_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	460479,975(a)	7	65782,854	85,369	,000
Intercept	399898140,625	1	399898140,625	518960,699	,000
Energia	427042,225	1	427042,225	554,186	,000
Aditivo	17617,875	3	5872,625	7,621	,001
Energia * Aditivo	15819,875	3	5273,292	6,843	,001
Error	24658,400	32	770,575		
Total	400383279,000	40			
Corrected Total	485138,375	39			

a R Squared = ,949 (Adjusted R Squared = ,938)

2.Comparação entre Metabolizabilidade (coleta total de excreta) e Digestibilidade (coleta ileal da digesta) de parâmetros das dietas de frangos aos 35 dias

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Matéria Seca

F	df1	df2	Sig.
1,137	15	64	,344

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Método_Coleta +Método_Coleta * Nível_Energia+Método_Coleta * Aditivos+Nível_Energia * Aditivos+Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Matéria Seca

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	166,531(a)	15	11,102	39,544	,000
Intercept	443896,339	1	443896,339	1581101,914	,000
Método_Coleta	14,973	1	14,973	53,332	,000
Método_Coleta * Nível_Energia	54,170	1	54,170	192,946	,000
Método_Coleta * Aditivos	,133	3	,044	,158	,924
Nível_Energia * Aditivos	,052	3	,017	,061	,980
Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos	,136	3	,045	,162	,922
Error	17,968	64	,281		
Total	444080,838	80			
Corrected Total	184,499	79			

a R Squared = ,903 (Adjusted R Squared = ,880)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Proteína bruta

F	df1	df2	Sig.
1,635	15	64	,089

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Método_Coleta+Nível_Energia+Aditivos+Método_Coleta * Nível_Energia+Método_Coleta * Aditivos+Nível_Energia * Aditivos+Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Proteína bruta

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	118,231(a)	15	7,882	7,654	,000
Intercept	402163,234	1	402163,234	390534,105	,000
Método_Coleta	2,398	1	2,398	2,328	,132
Nível_Energia	88,937	1	88,937	86,365	,000
Aditivos	2,402	3	,801	,777	,511
Método_Coleta * Nível_Energia	15,940	1	15,940	15,479	,000
Método_Coleta * Aditivos	2,303	3	,768	,745	,529
Nível_Energia * Aditivos	2,385	3	,795	,772	,514
Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos	3,867	3	1,289	1,252	,298
Error	65,906	64	1,030		
Total	402347,371	80			
Corrected Total	184,137	79			

a R Squared = ,642 (Adjusted R Squared = ,558)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: CDA_EB

F	df1	df2	Sig.
,585	15	64	,876

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Método_Coleta+Nível_Energia+Aditivos+Método_Coleta * Nível_Energia+Método_Coleta * Aditivos+Nível_Energia * Aditivos+Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CDA_EB

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	230,802(a)	15	15,387	38,312	,000
Intercept	474762,083	1	474762,083	1182108,433	,000
Método_Coleta	18,499	1	18,499	46,061	,000
Nível_Energia	162,137	1	162,137	403,703	,000
Aditivos	,222	3	,074	,185	,907
Método_Coleta * Nível_Energia	48,813	1	48,813	121,538	,000
Método_Coleta * Aditivos	,183	3	,061	,152	,928
Nível_Energia * Aditivos	,748	3	,249	,621	,604
Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos	,200	3	,067	,166	,919
Error	25,704	64	,402		
Total	475018,589	80			
Corrected Total	256,506	79			

a R Squared = ,900 (Adjusted R Squared = ,876)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a) –Energia metabolizável aparente (EMA)

Dependent Variable: EMA

F	df1	df2	Sig.
,597	15	64	,866

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Método_Coleta+ Método_Coleta * Nível_Energia+Método_Coleta * Aditivos+Nível_Energia * Aditivos+Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos

Tests of Between-Subjects Effects-Energia metabolizável aparente (EMA)

Dependent Variable: EMA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	638179,800(a)	15	42545,320	53,908	,000
Intercept	931803609,800	1	931803609,800	1180656,479	,000
Método_Coleta	108928,800	1	108928,800	138,020	,000
Método_Coleta * Nível_Energia	29799,200	1	29799,200	37,758	,000
Método_Coleta * Aditivos	353,600	3	117,867	,149	,930
Nível_Energia * Aditivos	1478,800	3	492,933	,625	,602
Método_Coleta * Nível_Energia * Aditivos	412,400	3	137,467	,174	,913
Error	50510,400	64	789,225		
Total	932492300,000	80			
Corrected Total	688690,200	79			

a R Squared = ,927 (Adjusted R Squared = ,909)

3. Produção de resíduos de frangos de corte (11-14 e 32-35 dias)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Produção de dejetos na material natural (PD_MN)

Dependent Variable: PD_MN_14dias

F	df1	df2	Sig.
,205	7	32	,982

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PD_MN_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	19437,600(a)	7	2776,800	212,956	,000
Intercept	1587245,520	1	1587245,520	121727,607	,000
Energia	19316,465	1	19316,465	1481,401	,000
Aditivo	105,602	3	35,201	2,700	,062
Energia * Aditivo	15,533	3	5,178	,397	,756
Error	417,258	32	13,039		
Total	1607100,378	40			
Corrected Total	19854,858	39			

a R Squared = ,979 (Adjusted R Squared = ,974)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)- Produção de dejetos na material seca (PD_MS)

Dependent Variable: PD_MS_14dias

F	df1	df2	Sig.
1,020	7	32	,436

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PD_MS_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	606,249(a)	7	86,607	66,243	,000
Intercept	106931,111	1	106931,111	81788,662	,000
Energia	528,893	1	528,893	404,535	,000
Aditivo	45,082	3	15,027	11,494	,000
Energia * Aditivo	32,274	3	10,758	8,229	,000
Error	41,837	32	1,307		
Total	107579,196	40			
Corrected Total	648,086	39			

a R Squared = ,935 (Adjusted R Squared = ,921)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Excreção de água (EXC_H2O)

Dependent Variable: Exc_H2O_14dias

F	df1	df2	Sig.
,144	7	32	,994

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Exc_H2O_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13496,140(a)	7	1928,020	239,374	,000
Intercept	870211,650	1	870211,650	108041,621	,000
Energia	13452,390	1	13452,390	1670,189	,000
Aditivo	32,765	3	10,922	1,356	,274
Energia * Aditivo	10,984	3	3,661	,455	,716
Error	257,741	32	8,054		
Total	883965,531	40			
Corrected Total	13753,881	39			

a R Squared = ,981 (Adjusted R Squared = ,977)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Coeficiente de residuo (CR)

Dependent Variable: CR_14dias

F	df1	df2	Sig.
1,302	7	32	,281

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CR_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,030(a)	7	,004	60,501	,000
Intercept	4,725	1	4,725	67402,020	,000
Energia	,027	1	,027	379,533	,000
Aditivo	,002	3	,001	8,255	,000
Energia * Aditivo	,001	3	,000	6,403	,002
Error	,002	32	7,01E-005		
Total	4,757	40			
Corrected Total	,032	39			

a R Squared = ,930 (Adjusted R Squared = ,914)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Excreção de nitrogênio (Exc_N)

Dependent Variable: Exc_N_14dias

F	df1	df2	Sig.
,575	7	32	,771

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Exc_N_14dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,081(a)	7	,012	42,578	,000
Intercept	26,909	1	26,909	98793,870	,000
Energia	,048	1	,048	177,386	,000
Aditivo	,019	3	,006	23,806	,000
Energia * Aditivo	,013	3	,004	16,414	,000
Error	,009	32	,000		
Total	26,999	40			
Corrected Total	,090	39			

a R Squared = ,903 (Adjusted R Squared = ,882)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Produção de dejetto na material seca (PD_MN)

Dependent Variable: PD_MN_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,139	7	32	,364

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PD_MN_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	110825,456(a)	7	15832,208	153,980	,000
Intercept	8579372,100	1	8579372,100	83440,950	,000
Energia	110657,776	1	110657,776	1076,231	,000
Aditivo	158,098	3	52,699	,513	,677
Energia * Aditivo	9,581	3	3,194	,031	,992
Error	3290,230	32	102,820		
Total	8693487,785	40			
Corrected Total	114115,685	39			

a R Squared = ,971 (Adjusted R Squared = ,965)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Produção de dejetos na material seca (PD_MS)

Dependent Variable: PD_MS_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,950	7	32	,094

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PD_MS_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4627,333(a)	7	661,048	122,715	,000
Intercept	505220,024	1	505220,024	93787,306	,000
Energia	4604,458	1	4604,458	854,756	,000
Aditivo	14,890	3	4,963	,921	,442
Energia * Aditivo	7,985	3	2,662	,494	,689
Error	172,380	32	5,387		
Total	510019,737	40			
Corrected Total	4799,713	39			

a R Squared = ,964 (Adjusted R Squared = ,956)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)- Excreção de água (Exc_H2O)

Dependent Variable: Exc_H2O_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,456	7	32	,218

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Exc_H2O_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	70017,193(a)	7	10002,456	115,573	,000
Intercept	4922418,584	1	4922418,584	56875,833	,000
Energia	69908,829	1	69908,829	807,758	,000
Aditivo	83,879	3	27,960	,323	,809
Energia * Aditivo	24,485	3	8,162	,094	,963
Error	2769,496	32	86,547		
Total	4995205,273	40			
Corrected Total	72786,689	39			

a R Squared = ,962 (Adjusted R Squared = ,954)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Coeficiente de residuo (CR)

Dependent Variable: CR_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,852	7	32	,111

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CR_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,060(a)	7	,009	75,547	,000
Intercept	7,916	1	7,916	69595,876	,000
Energia	,060	1	,060	528,080	,000
Aditivo	6,69E-005	3	2,23E-005	,196	,898
Energia * Aditivo	1,81E-005	3	6,03E-006	,053	,984
Error	,004	32	,000		
Total	7,979	40			
Corrected Total	,064	39			

a R Squared = ,943 (Adjusted R Squared = ,930)

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)-Excreção de Nitrogênio (Exc_N)

Dependent Variable: Exc_N_35dias

F	df1	df2	Sig.
1,481	7	32	,209

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Energia+Aditivo+Energia * Aditivo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Exc_N_35dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,522(a)	7	,075	18,297	,000
Intercept	89,889	1	89,889	22052,638	,000
Energia	,500	1	,500	122,604	,000
Aditivo	,012	3	,004	,969	,419
Energia * Aditivo	,010	3	,003	,857	,473
Error	,130	32	,004		
Total	90,542	40			
Corrected Total	,653	39			

a R Squared = ,800 (Adjusted R Squared = ,756)

APÊNCIDE G- Composição do probiótico

SIPE 2000 - Rótulo do produto

Page 1 of 2



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
SUPERINTENDÊNCIA FEDERAL DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Croquis de Rótulo

CRINA POULTRY

Aditivo aromatizante

Indicação do produto:

Aditivo aromatizante destinado a auxiliar na melhora do desempenho de aves de corte. Uso exclusivo para fabricante de produtos destinados à alimentação animal.

Composição básica do produto:

ACIDO TÂNICO, CELULOSE EM PO, CARBONATO DE CALCIO, HIDROXIDO DE TOLUENO BUTILADO (B.H.T.), SEMOLA DE TRIGO, PROTEINA CONCENTRADA DE SORO DE LEITE, DIOXIDO DE SILICIO, OLEO ESSENCIAL DE CRAVO, OLEO ESSENCIAL DE TOMILHO

Eventuais substitutivos:

Níveis de garantia do produto:

OLEO DE TOMILHO	150,0000 g/kg
Oleo de Cravo	70,0000 g/kg

Modo de usar:

Ração inicial: de 100 a 150 mg/kg. Ração Crescimento e ração acabamento: de 50 a 100 mg/kg.

Data de fabricação:

Prazo de validade: 12 meses após a fabricação

Modo de conservação:

Conservar em local seco e fresco, até 25 graus C.

Empresa Importadora:

CNPJ: 004.578.257/0001-86

Inscrição Estadual: 116197209116

Razão Social: DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda.

Endereço: AVENIDA ENGENHEIRO BILLINGS, 1729 - PREDIO 9

5.VITA

Ione Iolanda dos Santos, filha de Alcides Bento dos Santos e Iolanda Cândida dos Santos, nasceu na cidade de Florianópolis, SC, em março de 1969.

Cursou o Ensino Fundamental na Escola Básica Prof. Acácio Garibaldi São Tiago e o Ensino Médio no Instituto Estadual de Educação em Florianópolis, SC.

Em setembro de 1999 concluiu seus estudos de graduação recebendo o grau de Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

Em março de 2000 iniciou seus estudos de Mestrado na Universidade Federal de Santa Catarina, SC e em abril de 2002 recebeu o título de Mestre em agroecossistemas.

Em agosto de 2006 ingressou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.