

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**PREBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE:
DESEMPENHO E AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA**

EVERTON MORENO MURO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

BOTUCATU - SP

Agosto, 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**PREBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE:
DESEMPENHO E AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA**

EVERTON MORENO MURO
Mestre em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato
Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Sartori

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal

BOTUCATU - SP
Agosto, 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M977p Muro, Everton Moreno, 1988-
Prebióticos na alimentação de frangos de corte: desempenho e ação imunomodulatória / Everton Moreno Muro. - Botucatu: [s.n.], 2018
xi, 78 f.: tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
2018

Orientador: Antonio Celso Pezzato
Coorientador: José Roberto Sartori
Inclui bibliografia

1. Frango de corte - Alimentação e rações. 2. Prebióticos. 3. Antibióticos. 4. *Salmonella*. I. Pezzato, Antonio Celso. II. Sartori, José Roberto. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

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

BIOGRAFIA

EVERTON MORENO MURO, filho de Maria Aparecida Moreno e de Aloisio Martins Muro, nasceu no município de Santo André, no estado de São Paulo, no dia 24 de março de 1988.

Em 2006, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, concluindo-o no ano de 2010, com o trabalho intitulado “Bem-estar animal e seus reflexos no abatedouro”.

Atuou na indústria alimentícia nas áreas de Produção Certificada de Aves, Planejamento de Produção, Protocolos de Controle e Garantia da Qualidade, e de Bem-estar Animal em frigoríficos avícolas.

Em 2012, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ), da FMVZ/Unesp, concluindo o Curso em janeiro de 2015, com a Dissertação intitulada “*Baccharis dracunculifolia* na Alimentação de Frangos de Corte”, atuando nas áreas de aditivos substitutos de antibióticos, histologia, histomorfometria e técnica de isótopos estáveis na Zootecnia.

Em janeiro de 2015, iniciou o Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ), da FMVZ/Unesp, onde desenvolveu trabalhos com Eubióticos, indicadores produtivos, de saúde e microbiologia em frangos de corte.

DEDICO

A minha mãe, Maria Aparecida Moreno;

Aos meus avós, Hilda Maria Moreno e Aparecido Moreno Ocete (*in memoriam*);

OFEREÇO

Ao meu irmão, Evandro Moreno Muro;

Ao meu sobrinho Luca Villar Muro;

Ao meu pai, Aloisio Martins Muro;

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato, pelos ensinamentos, conversas, paciência e acima de tudo por confiar em meus trabalhos e decisões nesses anos todos de mestrado e doutorado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Roberto Sartori, pela amizade e dedicação não só ao meu trabalho, mas a todos do Laboratório de Nutrição de Aves, e grande responsável pelo meu amor à nutrição e à avicultura.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, todos os seus funcionários e professores, por manter sempre com muito esforço e dedicação a responsabilidade pela excelência na formação de todos os seus alunos.

À *YesSinergy do Brasil* e a Dra. Fabiana Golin Luiggi pela parceria e pelo auxílio financeiro à condução do projeto.

Aos professores do *Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal* e *Departamento de Produção Animal* pelas orientações e colaboração essencial à execução dessa pesquisa e ao exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Adriano Sakae Okamoto do *Departamento de Clínica Veterinária*, pela orientação nas análises microbiológicas e aos alunos de pós-graduação da Ornitopatologia, por gentilmente colaborarem na execução das análises.

Ao *Departamento de Fitopatologia* da Faculdade de Ciências Agrônomicas pela ajuda fundamental à confecção de material para plaqueamento.

À toda a equipe de pós-graduandos e estagiários do *Laboratório de Nutrição de Aves*: Juliana Denadai, Guilherme Aguiar, Leonardo Zanetti, Tatiane Souza, Lívia Dornelas, Armando Contin, Raimundo Netto, Robert Guaraci, Julianna Batistioli e Daniele Silva, pela ajuda e amizade inestimável, ajuda na execução do projeto, coletas e pela paciência na longa execução do doutorado.

A Ana Carolina, pela ajuda e apoio durante o mestrado e doutorado.

Ao querido amigo e funcionário do *Laboratório de Nutrição de Aves*, Vanderlei Thiago da Silva, pelos dez anos de companheirismo, amizade e auxílio nos experimentos.

Aos amigos e funcionários da *Fábrica de Rações* da FMVZ pelo serviço fundamental, e sempre descontraído, à execução do projeto;

Aos queridos amigos companheiros Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho (*Revoltado*), Leticia Rocha Inamassu (*Purê*) e Javer Alves Vieira Filho pelo apoio, opiniões e compartilhamento de ideias, momentos de descontração e amizade.

Às queridas amigas de pós-graduação e grande incentivadoras do início do doutorado, Daniella Aparecida Berto (*Amapô*) e Nathália Martins Guerra Causso (*Mc*) pelo carinho de sempre, e amizade apesar da distância.

À minha amada Pretinha.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente a este trabalho e injustamente foram esquecidos.

EPÍGRAFE

“Não importa o quanto o vento sopra, a montanha jamais se curva diante dele”
Pat Morita.

PREBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO E AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA

RESUMO. Para avaliar a inclusão de diferentes combinações e níveis de prebióticos em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho, dois experimentos foram delineados. No primeiro estudo, 1250 pintos de corte machos, linhagem ROSS AP95, foram casualmente distribuídos em 5 tratamentos, com 10 repetições cada, objetivando testar diferentes proporções de mananos com β -glucanos e frutoligossacarídeos com galactoligossacarídeos, combinados e incluídos em dietas de frangos de corte. Os tratamentos consistiram de: CP, dieta basal (DB) +AMD; DB+BUT: DB + Butirato de Cálcio; GM1/3+FG2/3: DB + GLUCANMOS (1/3 da mistura) : FOS:GOS (2/3 da mistura); GM1/2+FG1/2: DB + GLUCANMOS (1/2 da mistura) : FOS:GOS (1/2 da mistura); GM2/3+FG1/3: DB + GLUCAN MOS (2/3 da mistura) : FOS:GOS (1/3 da mistura). No segundo estudo, 1250 pintos de corte machos, linhagem ROSS AP95, foram casualmente distribuídos em 5 tratamentos, com 10 repetições cada, objetivando testar diferentes níveis de inclusão de GLUCANMOS (67% da mistura) associado a FOS:GOS (1:1). Os tratamentos consistiram de: CP, dieta basal (DB) +AMD; 0,1%; 0,2%; 0,3% e 0,4% de inclusão da mistura prebiótica. Foram avaliados o desempenho, peso relativo de órgãos, barreiras físicas e imunológicas dos segmentos do intestino delgado (integridade de vilosidades, células caliciformes e linfócitos intraepiteliais), histomorfometria de Bursa de Fabricius e contagem diferencial de leucócitos no sangue, ainda, foram quantificados os ácidos graxos de cadeia curta nos cecos e realizada contagem de unidades formadoras de colônias de *E. coli* e teste da atividade inibitória *in vitro* das substâncias antagonicas produzidas pelas amostras do *pool* de bactérias ácido lácticas cecais frente à *Salmonella enterica* serovar Heidelberg. Os dados foram submetidos a ANOVA seguida de teste de médias de Tukey (5%), as contagens sanguíneas foram submetidas ao teste de medianas de Kruskal-Wallis (5%), no segundo estudo, adicionalmente, foi realizada análise de regressão para os níveis. As alterações na histomorfometria intestinal, de Bursa, microbiologia e microambiente cecais, não refletiram no desempenho das aves ao final do período de criação, independente dos tratamentos aplicados. Considerando que não há prejuízo ao ganho de peso, é possível recomendar as combinações e níveis prebióticos em substituição aos AMD, a decisão recai então no fator preço e no retorno financeiro esperado ao investimento no produto.

Palavras-chave: AGCC, Antibiótico, FOS, GOS, MOS, *Salmonella*.

PREBIOTICS IN BROILER FEEDING: PERFORMANCE AND IMMUNOMODULATORY ACTIVITY

ABSTRACT. Aiming to evaluate the effects of different combinations and levels of prebiotics included in broiler chicken diets, replacing performance-enhancing antibiotics (PEA), on the birds' performance and health, two experiments were delineated. For the first study, 1250 male ROSS AP95 day-old chicks were randomly distributed in 5 treatments, with 10 experimental units each, to test different proportions of mannan with β -glucans and fructooligosaccharides with galactooligosaccharides, combined and included in diets. Treatments consisted of: positive control (PD), basal diet (BD) + PEA; BD + BUT: BD + Calcium Butyrate; GM1 / 3 + FG2 / 3: BD + GLUCANMOS (1/3 of the blend): FOS: GOS (2/3 of the blend); GM1 / 2 + FG1 / 2: BD + GLUCANMOS (1/2 of the blend): FOS: GOS (1/2 of the blend); GM2 / 3 + FG1 / 3: BD + GLUCAN MOS (2/3 of the blend): FOS: GOS (1/3 of the blend). In the second study, 1250 male ROSS AP95 day-old chicks were randomly distributed in 5 treatments with 10 experimental units each, to determine the optimal inclusion level of GLUCANMOS (67% of the mixture) associated with FOS: GOS (1: 1). Treatments consisted of positive control (PC), basal diet (BD) + PEA; 0.1%; 0.2%; 0.3% and 0.4% inclusion of the prebiotic mixture. Performance, relative organs weight, physical and immunological barriers of the small intestine segments (integrity of villi, goblet cells and intraepithelial lymphocytes), Bursa of Fabricius histomorphometry and differential leukocyte count in the blood; short chain fatty acids quantification in cecal content, counts of *E. coli* colony forming units and *in vitro* test of inhibitory activity of the antagonistic substances produced by the samples of the cecal lactic acid bacterial pool against *Salmonella enterica* serovar Heidelberg were also evaluated. Data were submitted to ANOVA followed by Tukey means test (5%), blood counts were submitted to Kruskal-Wallis median test (5%), in the second study, regression analysis was performed for levels. Changes in intestinal and Bursa histomorphometry, microbiology and cecal microenvironment, did not reflect on birds performance at the end of the breeding period, regardless of the treatments applied. Considering that there is no damage to the productive traits, it is possible to recommend the combinations and prebiotic levels in substitution of PEA, the decision for the combination to be adopted then falls on price factor and expected financial return to the investment in the product.

Key words: Antibiotic, FOS, GOS, MOS, *Salmonella*, SCFA.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. PREBIOTICOS: CONCEITO E HISTÓRICO.....	3
3. PRINCIPAIS PREBIÓTICOS	4
3.1. Mananoligossacarídeos	4
3.2. B-glucanos	5
3.3. Frutoligossacarídeos.....	5
3.4. Galactoligossacarídeos	7
4. UTILIZAÇÃO DE PREBIÓTICOS COMO ADITIVOS ALIMENTARES E SEUS OBJETIVOS	8
4.1. CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	8
4.2. DESEMPENHO E BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES	8
4.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA	9
4.4. REDUÇÃO DO USO DE ANTIBIÓTICOS NA PECUÁRIA.....	10
4.5. SAÚDE INTESTINAL	11
4.5.1. FERMENTAÇÃO E MICROBIOLOGIA.....	11
4.5.2. MORFOLOGIA INTESTINAL.....	13
5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GLOBAL.....	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
 CAPÍTULO II	 23
Resumo.....	24
Abstract	25

1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVO	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Delineamento Experimental	27
3.2. Variáveis Analisadas	29
3.3. Avaliação Estatística	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO III.....	50
Resumo.....	51
Abstract.	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. OBJETIVO	54
3. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1. Delineamento Experimental	54
3.2. Variáveis Analisadas	55
3.3. Avaliação Estatística	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
CAPÍTULO V	76
1. IMPLICAÇÕES	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição centesimal e nutricionais das dietas experimentais.	28
Tabela 2. Desempenho de frangos de corte recebendo dietas contendo diferentes combinações de prebióticos.	34
Tabela 3. Peso relativo ¹ (%) de órgãos de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade recebendo dietas contendo diferentes combinações de prebióticos.	36
Tabela 4. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.	38
Tabela 5. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) e densidade de células caliciformes (GC) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.	39
Tabela 6. Ácidos graxos de cadeia curta em conteúdo cecal de frangos de corte recebendo dietas contendo diferentes combinações de prebióticos.....	42
Tabela 7. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.	43
Tabela 8. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.	44
Tabela 9. Contagem de unidades formadoras de colônia de E. coli cecal e halos de inibição de bactérias ácido lácticas ^(*) contra Salmonella enterica serovar Heidelberg de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.....	44

CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição centesimais e nutricionais das dietas experimentais.	56
Tabela 2. Desempenho de frangos de corte recebendo dietas contendo diferentes níveis de prebióticos.	62
Tabela 3. Peso relativo ¹ (%) de órgãos de frangos de corte aos 21e 42 dias de idade recebendo dietas contendo diferentes níveis de prebióticos	64
Tabela 4. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.....	65
Tabela 5. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.....	67
Tabela 6. Ácidos graxos de cadeia curta em conteúdo cecal de frangos de corte recebendo dietas contendo níveis de prebióticos.....	69
Tabela 7. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.....	70
Tabela 8. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.....	71
Tabela 9. Contagem de unidades formadoras de colônia de E. coli cecal e halos de inibição de bactérias ácido lácticas(*) contra Salmonella enterica serovar Heidelberg de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.....	72

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é o setor da produção animal mais moderno e eficiente do país, além de um dos mais competitivos em nível mundial. Um dos fatores que contribui para o aumento da produtividade é, sem dúvida, a utilização de aditivos na dieta. O termo aditivo inclui todas as substâncias, as quais, quando adicionadas às rações, são capazes de melhorar o desempenho animal ou as características físicas dos alimentos (SILVA, 2000; ARAUJO et al., 2007).

A busca constante por uma alta produtividade, visando sempre a qualidade do produto final com o menor custo possível, fez com que a inclusão de antibióticos como promotor de crescimento na alimentação animal fosse inevitável, seu uso na ração impede que os microrganismos patogênicos se multipliquem no intestino do animal, permitindo assim que os nutrientes da dieta sejam aproveitados em tecidos de interesse zootécnico ao invés de gerar desvios como ao sistema imune, por exemplo. Entretanto, o uso dos antibióticos em concentrações subterapêuticas por mais de 50 anos, resultou no desenvolvimento de populações bacterianas resistentes nos animais e no homem. Diante disso, grupos de consumidores começaram a apresentar restrição ao consumo de produtos avícolas que tem antibióticos incluídos na alimentação das aves.

Uma dessas alternativas é a utilização de prebióticos, probióticos e simbióticos, moléculas que demonstram eficiência na modulação benéfica da microbiota intestinal, na resposta imunológica e no desempenho zootécnico sem aumentar os custos de produção.

A partir dessa premissa, os estudos com substitutos de antibióticos na alimentação animal e a busca por compostos que possam melhorar a saúde animal e mantenham a produtividade e qualidade dos produtos finais intensificaram-se; sendo que a utilização de prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos, enzimas, aminoácidos, vitaminas, extratos e óleos vegetais e também microminerais, têm sido estudada (HANNAS & PUPA, 2003; VOGT, 2005; SANTURIO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; FASCINA, 2011; RAMOS et al., 2011; OBA et al., 2012). As recentes pesquisas sobre o assunto avaliam a ação dos produtos alternativos sobre microrganismos patógenos, bem como as ações imunoestimuladoras e de proteção morfofuncional do intestino.

2. PREBIÓTICOS: CONCEITO E HISTÓRICO

Os estudos sobre os prebióticos e sua relação com saúde humana iniciam-se já na década de 1950, com a descoberta de que o leite humano possui compostos que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial e, conseqüentemente, potencializavam o crescimento das populações de bifidobactérias e lactobacilos, aliviando os sintomas de encefalopatia hepática em bebês (WALKER; DUFFY, 1998; NICOLI; VIEIRA, 2000); esses resultados incentivaram o estudo de novos compostos não digestíveis sobre a microbiota intestinal e seus possíveis benefícios à saúde (KULLEN et al., 1998; SHEEHY; MORRISSEY, 1998; STRICKLING et al., 2000).

Gibson e Roberfroid (1995) definem prebióticos como ingredientes alimentares que são digeridos na porção proximal do trato gastrintestinal de não-ruminantes e que proporcionam efeito benéfico ao hospedeiro via estimulação seletiva do crescimento e/ou metabolismo de um determinado grupo de bactérias no cólon. Andreatti Filho e Silva (2005) complementam que, para ser considerada molécula prebiótica, o ingrediente, ainda, não poder ser hidrolisado nem absorvido no intestino delgado, seja capaz de selecionar populações benéficas bacterianas por ser substrato seletivo específico e essa alteração seja favorável ao hospedeiro, induzindo efeitos benéficos sistêmicos ou em nível da luz intestinal.

Portanto, com base nessa definição, carboidratos indigestíveis, alguns peptídeos, lipídeos, fibras e alguns álcoois de açúcares podem ser considerados prebióticos. As substâncias mais extensivamente estudadas como prebióticas são os oligossacarídeos, principalmente frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS). Os oligossacarídeos são carboidratos constituídos de cadeias curtas de polissacarídeos, compostos de três a dez açúcares simples ligados entre si (SILVA, 2000; ANDREATTI FILHO; SILVA, 2005; JUNQUEIRA; DUARTE, 2005); FOS, por sua vez, são polímeros ricos em frutose, de origem natural e derivados de plantas (inulina) como a chicória - sua principal fonte para obtenção industrial - alcachofra, dália, alho e cereais; ou sintéticos, resultantes da polimerização da frutose (GIBSON; ROBERFROID, 1995; IJI; TIVEY, 1998); GOS e MOS são obtidos a partir da parede

celular de leveduras e contém glucose e manose, respectivamente, como os dois principais açúcares em proporções semelhantes e N-acetilglucosamina.

Silva e Nörnberg (2003), concluíram que prebióticos são compostos biologicamente seguros à saúde humana e animal, contudo, as respostas biológicas na nutrição animal nem sempre são evidenciadas, o que pode estar relacionado com a composição química dos demais ingredientes, com a dosagem adicionada, com a adaptação e a seletividade da microbiota ao prebiótico ou ao nível de estresse do animal. De maneira que estudos com diferentes níveis, combinações e tipos de prebióticos são altamente justificáveis.

3. PRINCIPAIS PREBIÓTICOS

3.1. Mananoligossacarídeos

O mananoligossacarídeos (MOS), quando adicionado às dietas animais, consiste de fragmentos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* com uma estrutura complexa de manose fosforilada, glucose e proteína (SPRING, 2000).

A parede celular é separada do conteúdo intracelular, e a solução contendo MOS é evaporada em baixa temperatura (spray dried) para evitar a destruição da parte funcional da molécula de MOS, a separação pode ainda dar-se por tratamento enzimático (Spring et al., 2004).

Os MOS atuam como ligantes de alta afinidade, pois proporcionam sítios de adsorção competitiva para determinada classe de bactérias, os patógenos gram-negativos com fímbrias tipo-1 manose específicas, como a *Salmonella* e *Escherichia coli* aderem-se aos MOS e não às células epiteliais, e são eliminados com a excreta, prevenindo assim, a colonização do trato responsável por doenças, ainda permitindo que sejam apresentados às células imunológicas como agentes atenuados, antes de serem eliminados do intestino (Santos Júnior, 2005).

Leslie (1996) verificou que a microbiota benéfica pode utilizar os mananoligossacarídeos como fonte de energia, ao contrário da maioria dos patógenos. Os benefícios dos MOS estendem-se a modificação da flora intestinal, a redução na taxa de turnover da mucosa e a modulação do sistema imune no lúmen intestinal, traduzidas em potencial de aumento na taxa de crescimento, na eficiência de conversão alimentar e na viabilidade das criações (SHANE, 2001).

3.2. B-glucanos

Os β -glucanos são polissacarídeos constituintes da parede celular de levedura, fungos e alguns cereais, que se diferenciam entre as unidades de ligação de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se ligam a essa cadeia. Quase 75% do peso seco da parede celular das leveduras são compostos por polissacarídeos. A estrutura da parede celular é constituída por um complexo de 1,3-D-glucano, 1,6-D-glucano e quitina, enquanto os componentes amorfos da matriz, como a camada fibrilar, localizada na parede da superfície da célula consiste de mananoproteína. Enquanto os D-glucanos e quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem sua morfologia e forma, mananoproteínas e sua porção de carboidratos D-manano, são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o ambiente e determinam a especificidade imunológica da levedura (RUIZ-HERRERA, 1992).

Os β -glucanos apesar de serem considerados fatores antinutricionais, também promovem o crescimento de bactérias ácido lácticas (benéficas) no intestino grosso, constituindo importante função para o controle de bactérias nocivas (O'CONNELL et al., 2005). Além disso os β -glucanos tem recebido especial atenção por sua bioatividade, principalmente no que se refere a imunomodulação. De acordo com Magnani e Castro-Gómez (2008) estes são designados como modificadores da resposta biológica, pois, ao serem reconhecidos pelo organismo desencadeia uma série de eventos na resposta imune. A modulação dos β -glucanos inclui a ativação de macrófagos e linfócitos polimorfonucleares, além da indução da expressão de diversas citocinas.

3.3. Frutoligossacarídeos

Os frutoligossacarídeos (FOS) são componentes de origem natural e sua biossíntese ocorre amplamente na natureza. Podem ser encontrados em quantidades expressivas em alimentos como, cebola, banana, alcachofra, alho, raízes de almeirão, beterraba (GIBSON e ROBERFROID, 1995; HATERMINK, VANLAERE e ROMBOUTS, 1997) e na raiz da yacon (GOTO et. al., 1995).

O emprego e a utilização de FOS como ingredientes alimentares tem crescido consideravelmente devido suas características de fibra (NINESS, 1999). Muitos

alimentos de interesse humano, como bebidas lácteas, doces, balas, sobremesas e geleias, apresentam FOS em sua formulação (TANAKA e MATSUMOTO, 1998).

Quimicamente os FOS são formados por oligômeros de frutose que são compostos de 1- cestose, nistose e frutofuranosil nistose em que as unidades de frutossil são ligadas na posição $\beta(2-1)$ da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996). Esse tipo de ligação confere aos FOS a resistência à digestão ou hidrólise digestiva (FAGUNDES e COSTA, 2003), permitindo sua chegada intacta aos sítios de fermentação microbiológica.

Nas plantas, a síntese dos frutoligossacarídeos inicia-se a partir da transferência de uma unidade de frutose entre duas moléculas de sacarose, portanto alguns FOS apresentam uma molécula de glicose na extremidade da cadeia (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

O grau de polimerização (GP), definido pelo número de unidades de monossacarídeos, é usado para definir e classificar as moléculas de FOS e inulina, sendo que os FOS apresentam $GP < 10$ e a inulina GP de 2 a 60 (SPIEGEL, ROSE e KARABELL, 1994; YUN, 1996). O tamanho das cadeias de inulina e de FOS também é responsável pelas diferentes propriedades desses compostos. A inulina é menos solúvel, apresenta cadeias longas (GP até 60) e capacidade para formar microcristais quando misturada com água e leite (GIBSON, WILLIS e VAN LOO, 1994). Esses microcristais formam mistura cremosa que dá a sensação de presença de gordura (NINESS, 1999).

Os FOS, por sua vez, apresentam cadeias curtas (GP 2-9) e são altamente higroscópicos. Sua capacidade de retenção de água é superior à da sacarose e similar à do sorbitol. Tratando-se de carboidratos não-redutores não participam nas reações de Maillard (DREVON e BORNET, 1992). Essas fibras alimentares são altamente estáveis, suportam pH acima de 3 e temperatura superior a 140°C (BORNET, 1994). Sua solubilidade em água atinge 80% a 25°C. Também são solúveis em etanol a 80%, pH 2 e 0°C, diferentemente de outros polissacarídeos (VAN LOO et al., 1998; QUINTEROS, 2000).

3.4. Galactoligossacarídeos

Os galactoligossacarídeos (GOS) são produzidos a partir da lactose por atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase. A enzima β -D-galactosídeo galactohidrolase, designada usualmente como β -galactosidase, é igualmente responsável pela reação de hidrólise da lactose, formando galactose e glicose. O sítio ativo da β -galactosidase possui habilidade similar tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose (JURADO et al., 2002). Os oligossacarídeos obtidos a partir da transgalactosilação da galactose por ação da β -galactosidase em substratos ricos em lactose são principalmente formados por estruturas com ligações β -1,4 e β -1,6 (MACFARLENE et al., 2008).

A formação de GOS ocorre a partir de um substrato rico em lactose, notadamente o leite, o soro de leite ou uma mistura entre ambos. O acréscimo de soro de leite a uma base láctea que serve de substrato à ação da β -galactosidase implica no aumento da disponibilidade de lactose no meio, no incremento de proteína e na redução da atividade de água. A taxa de conversão da lactose aumenta com o incremento da concentração inicial do substrato, tendo em vista o efeito de redução da atividade de água na solução (PESSELA et al., 2003).

Muitos são os efeitos benéficos dos GOS citados na literatura: modificação significativa na microflora colonizadora do cólon; estímulo à produção de nutrientes; decréscimo no pH do cólon e maior produção dos ácidos graxos de cadeia curta; incremento na excreção fecal de massa seca; aumento na umidade do bolo fecal através de pressão osmótica; inibição da diarreia; efeito protetor contra infecções nos tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital; aumento na capacidade de absorção de diferentes minerais, como o cálcio; efeito benéfico no metabolismo de carboidratos e de lipídios e redução do risco de câncer de cólon (MUSSATTO e MANSILHA, 2007).

4. UTILIZAÇÃO DE PREBIÓTICOS COMO ADITIVOS ALIMENTARES E SEUS OBJETIVOS

4.1. CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Prebióticos constituídos por xilose, frutose, galactose, manose e glicose, recebem atenção especial e se mostram particularmente promissores no campo de estudo de controle e redução de carga bacteriana patogênica (GIBSON E ROBERFROID, 1995). Alguns demonstrando capacidade de proteção contra *Salmonella* pela disponibilidade de sítios de ligação para estas bactérias e posterior expulsão do trato digestivo (CHARALAMPOPOLUS E RASTALL, 2009). Spring et al (2000), estudaram a capacidade de diversas cepas bacterianas em aglutinar mananoligossacarídeos em preparos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), e demonstraram que cinco em sete cepas de *E. coli* e sete de dez cepas de *Salmonella enteritidis* aglutinaram MOS e células íntegras de *S. cerevisiae*.

4.2. DESEMPENHO E BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES

O efeito saciogênico dos prebióticos deriva de estímulo à produção de peptídeo intestinal anorexigênico (GLP-1, peptídeo semelhante a glucagon 1) e declínio na produção de peptídeo orexigênico (Ghrelin). Estes peptídeos entero-endócrinos regulam diversos processos metabólicos e fisiológicos, criando uma ponte entre intestino e cérebro (WYNNE et al., 2005).

Xu et al. (2003) verificaram um efeito dose-dependente de FOS em ganho de peso diário em frangos de corte. Aumento de peso de carcaça e de peso de gordura abdominal foram observados em frangos suplementados com MOS e inulina (SAMARASINGHE et al, 2003;. YUSRIZAL E CHEN, 2003).

A digestibilidade da proteína pode ser negativamente impactada pelo consumo de prebióticos. A diminuição do metabolismo de proteínas e aumento na fermentação intestinal culminam em maior quantidade de nitrogênio fixado em biomassa bacteriana, isto sugere um incremento de massa fecal, mudando a direção da excreção de ureia do sangue da urina para as fezes. Estas bactérias também convertem amônia neutra para NH_4^+ , assim, bloqueando sua absorção, sendo excretada através das fezes ao invés dos

rins. Em pintos jovens, a digestibilidade de aminoácidos e a energia metabolizável diminuíram em resposta à suplementação com prebiótico (BIGGS et al., 2007), ao passo que a digestibilidade da fibra foi melhorada ($p < 0,05$) devido a suplementação com MOS (PAWAR et al., 2008; KORE et al., 2009) e prebiótico derivado de alcachofra (SAMAL et al., 2012).

4.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A resposta imunológica das aves é formada pela imunidade natural/inata e adquirida/específica. A imunidade inata não só é responsável pela primeira linha de defesa contra microrganismos, mas também participa da indução de respostas imunes específicas, a qual é composta de imunidade humoral e celular. O desenvolvimento destas respostas específicas é desencadeado somente após contato com o antígeno e possui especificidade no reconhecimento dos invasores e o desenvolvimento da memória; portanto, resulta em uma resposta mais rápida do que ocorre na exposição primária (KOGUT, KLASING; 2009).

Os frangos de corte têm estruturas linfoides distribuídas ao longo do trato gastrointestinal, podendo apresentarem-se de forma difusa ou agregados. Os componentes difusos incluem os linfócitos intraepiteliais, bem como da mucosa e lâmina própria; os componentes agregados incluem as Placas de Peyer, tonsilas cecais e a Bursa de Fabricius. O estímulo imunológico da mucosa favorece a produção de anticorpos IgA, principalmente nas Placas de Peyer, que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (OLÁH; VERVELDE, 2008).

Carboidratos não digeríveis como os MOS podem estimular o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), bem como o SI sistêmico. Uma hipótese do funcionamento desse mecanismo de ação sugere que os receptores tipo Toll, presentes na membrana celular das células do GALT, possuem a capacidade de identificar moléculas denominadas PAMPs (“pathogen-associated molecular patterns”), as quais identificam o antígeno. As PAMPs podem ser encontradas em componentes da parede celular de levedura como mananos e glucanos juntamente com outras moléculas microbianas, tais como peptidoglicano, lipopolissacarídeo e glicolipídeos (BALLOU, 1970).

Os MOS, vinculados aos macrófagos, são reconhecidos como açúcares específicos encontrados em glicoproteínas da superfície bacteriana, desencadeando uma reação em cascata que acabaria por ativar macrófagos e promover a liberação de citocinas, ativando a resposta imune adquirida (COLLET, 2000).

Segundo alguns autores (SAVAGE; COTTER; ZAKRZEWSKA,, 1996; SHASHIDHARA; DEVEGOWDA, 2003), este prebiótico também apresenta propriedades imunomodulatórias, pois os MOS, em níveis elevados, aumentam a resposta dos anticorpos protetores e melhoram a resistência a doenças reduzindo a resposta aguda (SILVA et al., 2009). A redução da resposta imunológica aguda é fundamental para melhorar o desempenho dos animais, uma vez que essa resposta, ao ocorrer, é a que demanda mais tempo e recursos orgânicos do animal.

Além do efeito imunoestimulante e/ou imunomodulador próprio dos MOS, os prebióticos podem apresentar efeitos benéficos indiretos sobre o SI. Ao melhorar a saúde intestinal, beneficiam a absorção de nutrientes fundamentais ao bom funcionamento do SI, tais como Zn, Cu, Se (SHASHIDHARA; DEVEGOWDA, 2003). Da mesma forma, bactérias produtoras de ácido lático, as quais possuem seu crescimento favorecido pelo prebiótico, produzem substâncias imunomoduladoras que reagem com o SI em diferentes níveis, incluindo a produção de citocinas, células mononucleares e a fagocitose dos macrófagos, bem como a indução de grandes quantidades de imunoglobulinas, especialmente IgA (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002).

Dados relacionados a imunidade celular são escassos na literatura, sendo necessários mais estudos referentes a seus efeitos sobre a atividade do sistema imunológico.

4.4. REDUÇÃO DO USO DE ANTIBIÓTICOS NA PECUÁRIA

Eubióticos, tais como pre-, pro- e simbióticos, tem sido estudados, e são os principais focos destes estudos, pelo seu potencial em substituir antibióticos como melhoradores de desempenho em dietas animais, e, conseqüentemente, reduzir a possível resistência bacteriana gerada por aqueles. Os efeitos desejados nos animais são principalmente, assim como os desejados aos antibióticos, a manutenção de altas taxas de produtividade, particularmente em aves e suínos, ou diminuição da emissão de metano por ruminantes

(CHARALAMPOPOLUS; RASTALL, 2009). O consumo de prebióticos em longo prazo e de maneira profilática é mais segura a medida que não causa efeitos colaterais, como diarreia, sensibilidade à radiação UV e lesões hepáticas associadas aos antibióticos, bem como não estimulam a seleção de genes associados à resistência bacteriana e resposta inflamatória alérgica (FERKET, 2003; LEE; SALMINEN, 2009).

4.5. SAÚDE INTESTINAL

4.5.1. FERMENTAÇÃO E MICROBIOLOGIA

Prebióticos são fermentados no intestino posterior por bactérias benéficas, resultando na produção de ácidos orgânicos (ácido láctico e AGCC como acetato, propionato e butirato) e gases (CO_2 , CH_4 e H_2), sendo os primeiros extensivamente absorvidos, representando uma forma do hospedeiro recuperar parte da energia presente nestes carboidratos indigestíveis. A produção de ácido provoca a protonação de NH_3 potencialmente tóxico (e aminas) para produzir NH_4^+ . Este NH_4 não é difusível, causando queda nos níveis de NH_3 sanguíneos. A queda no pH cecal devido à atividade ácido-lática pode favorecer a proliferação de populações bacterianas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bactérias que são capazes de utilizar NH_3 como fonte primária de N, promovendo queda nas suas concentrações sanguíneas e intestinais.

Prebióticos estimulam seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium* SP., *Lactobacillus* SP. e determinadas bactérias produtoras de butirato (PRÉSTAMO et al., 2003; HUANG et al., 2012; RAMNANI et al, 2012; CARDONA et al, 2013; FECHNER et al, 2013; DUEÑAS et al., 2015). Ao mesmo tempo, suprimem o crescimento de *E. coli* toxinogênica e bactérias proteolíticas como *Clostridium perfringens*, *Streptococcus* SP., *peptococci*, *bacilli*, *Staphylococcus* SP., *bacteriodaeceae*, *pseudomonad*, leveduras e mofos (SAMARASINGHE et al., 2003; CAO et al., 2005; NAVIDSHAD et al., 2015). Em aves, observa-se a diminuição nas contagens de *Salmonella* sp. e *Campylobacter* SP. (YUSRIZAL; CHEN, 2003). A microbiota simbiótica inibe patógenos através de uma variedade de mecanismos que depende da espécie microbiana e o ecossistema em que elas residem. Os mecanismos mais prováveis são exclusão competitiva e resistência à colonização, produção de metabólitos tóxicos ou agentes antimicrobianos (redução de

pH, ácidos produtos de fermentação, bacteriocinas, etc.) contra bactérias patogênicas, competição por nutrientes e receptores na superfície epitelial, estimulação do sistema imunológico e aumento no valor osmótico no lúmen intestinal.

A adição de MOS reduz a excreção fecal de *Escherichia coli* com associado aumento na contagem de *Lactobacillus* sp. (PAWAR et al., 2008; KORE et al., 2009). As contagens de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. foram aumentadas significativamente ($p < 0,05$) no conteúdo cecal de ratos alimentados com chicória, indicativo de melhor fermentação cecal (SAMAL et al., 2015). Da mesma forma, as contagens fecais de *Bifidobacterium* sp. e *Lactobacillus* sp. foram significativamente maiores em cães alimentados com chicória, entretanto as contagens fecais de *Escherichia coli* e *Clostridium* sp. não foram alteradas (SAMAL et al., 2012). Modesto *et al.* (2009) relataram que FOS do açúcar de beterraba no nível de 4% tende a aumentar a *Bifidobacterium* sp endógena. A Contagem Total de Microrganismos Viáveis (TVC) intestinais e *E. coli* foram menores ($p < 0,01$) em aves recebendo dieta contendo MOS, enquanto a contagem de *Staphylococcus* sp., leveduras e mofos permaneceu inalterada. A TVC na carne de peito e coxa também foi baixa ($p < 0,05$) em frangos de corte alimentados com dietas contendo 0,2% de MOS (ELANGO VAN et al., 2005).

O uso de Bio-MOS em frangos de corte Vencob melhorou a qualidade de carcaça, reduzindo o peso do fígado, peso de coração e percentual de gordura abdominal, além de reduzir a contagem de *Escherichia coli* (MUNJ et al, 2010).

KLEESSEN et al. (2003) observaram redução no número de *C. perfringens* e uma redução nos níveis de endotoxinas bacterianas adicionando xarope de chicória em 0,5% na água de bebida de frangos de corte. Thitaram et al. (2005), estudando diferentes níveis de IMO, demonstraram aumento em *Bifidobacterium* sp. e significativa redução de *S. enterica* sorovar *typhimurium* inoculada presente no ceco de frangos de corte.

Da mesma forma, GOS mostrou um aumento significativo na população intestinal de *Bifidobacterium* sp. (JUNG et al., 2008). Concentrações de levedura intestinal e fecal aumentaram em resposta a suplementação de FOS e trans-galactoligossacarídeos (MIKKELSEN et al., 2003). Herfel et al. (2011) observaram aumento da população ileal de *Lactobacillus* sp., aumento nas concentrações de ácido propiônico e láctico e redução no pH, avaliando o efeito prebiótico de polidextrose.

4.5.2. MORFOLOGIA INTESTINAL

Aves recém-eclodidas têm seu sistema gastrintestinal imaturo, e sofrem processos adaptativos, buscando maior eficiência nos processos de digestão e absorção. Na eclosão o sistema digestório da ave está anatomicamente completo, mas sua capacidade funcional ainda não, assim o trato gastrintestinal sofre grandes alterações morfológicas e fisiológicas. As alterações morfológicas mais evidentes são: o aumento no comprimento do intestino, na altura e densidade dos vilos, no número de enterócitos e nas células caliciformes. As alterações fisiológicas estão relacionadas com o aumento da capacidade de digestão e de absorção do intestino, que ocorrem por aumento da produção de enzimas digestíveis. Essas alterações irão proporcionar um aumento na área de superfície de digestão e absorção.

Entretanto, os processos de absorção são dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal (MACARI; MAIORKA, 2000). O desenvolvimento da mucosa é estimulado por agentes tróficos, ou seja, aqueles que estimulam o processo mitótico na região cripta-vilo, e como consequência há o aumento do número de células e tamanho do vilo (MACARI; MAIORKA, 2000; MAIORKA, 2001). Primariamente há 2 eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação das células totipotentes localizadas na cripta e ao longo dos vilos) e, perda de células por descamação que ocorre naturalmente no ápice dos vilos (UNI et al., 1996; MAIORKA, 2001). Em frangos de corte essa renovação celular é de 72 a 96 horas, o que corresponde a 10% do seu ciclo de vida.

O equilíbrio entre os dois processos (perda e proliferação celular) determina um turnover (proliferação – migração – extrusão) e assegura a manutenção do número de células e da capacidade funcional do epitélio. No entanto, quando o intestino responde a algum agente estimulador a favor de um deles, deve ocorrer uma modificação na altura dos vilos (MACARI et al., 1994; UNI et al., 1996).

Se ocorrer um aumento na taxa de proliferação (mitose) com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão (perda celular) haverá um aumento no número de células e, conseqüentemente, observa-se um aumento na altura e densidade dos vilos e

microvilos, resultando na maior taxa de digestão e absorção (MAIORKA, 2001; FURLAN et al., 2004). Logo, caso ocorra um aumento na taxa de extrusão (perda celular), haverá uma redução no tamanho do vilo e ocorrerá um aumento na produção de células da cripta, com conseqüente aumento na profundidade de cripta (MAIORKA, 2001; FURLAN et al., 2004)

As células caliciformes presentes nos vilos e criptas, também possuem um importante papel na manutenção e desenvolvimento do epitélio intestinal. Estas são secretoras de muco, possuem função de proteger o epitélio durante a digestão, contra e quando da passagem de alimento e poder lubrificante sobre alimentos sólidos. Outro papel importante do muco seria na proteção contra infecções, ao funcionar como uma barreira protetora impedindo o contato de microrganismos com as células epiteliais. Portanto, as células caliciformes aumentam a produção de muco em caso de jejum ou alterações na dieta, pois estas situações podem ocasionar redução na camada de muco e propiciar ação de bactérias e protozoários patogênicos que causam destruição da mucosa (FURLAN et al., 2004).

Na literatura, trabalhos têm indicado que prebióticos, probióticos e simbióticos podem melhorar a integridade da mucosa intestinal, mostrando assim um efeito trófico e conseqüentemente melhorando também o desempenho das aves (LODDI, 2003).

Flemming (2005) relata que o aumento da produção de ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico) e lactato, produzidos pelos lactobacilos presentes nos probióticos, promoveriam a diminuição do pH do trato intestinal, com inibição de bactérias patogênicas e estímulo à proliferação de enterócitos, favorecendo assim a manutenção da integridade da mucosa intestinal e viabilizando a total capacidade de absorção intestinal das aves.

Macari e Maiorka (2000) relataram a capacidade indireta dos prebióticos em modificar as características da mucosa intestinal, favorecendo os mecanismos de proliferação celular por permitir maior sanidade da mucosa intestinal.

Apesar de haver grande número de experimentos mostrando a ação dos prebióticos, probióticos e simbióticos sobre a morfologia intestinal, os resultados se apresentam contraditórios, pois seus mecanismos de ação sobre a mucosa intestinal não são

totalmente elucidados. Entretanto, diversos estudos demonstram que estes aditivos são um importante alternativa ao uso de antibióticos e que podem trazer benefício à saúde das aves.

5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GLOBAL

Frente à crescente proibição da utilização de antibióticos melhoradores de desempenho e visando segurança do alimento, sustentabilidade, responsabilidade ambiental e financeira, adequação dos sistemas produtivos e manutenção da produtividade, torna-se necessária a busca e pesquisa de compostos alternativos seguros e eficazes aos AMD tradicionalmente utilizados na produção avícola.

A utilização de moléculas funcionais na nutrição animal tem potencial benéfico aos sistemas imune e desempenho das aves; entretanto, é necessário melhor entendimento dos benefícios destas na saúde dos animais, bem como quais combinações e níveis podem trazer efeitos adicionais à produtividade.

Diante do exposto, o presente estudo buscou determinar as combinações e níveis adequados de utilização de determinados prebióticos, bem como o efeito da inclusão destas destes sobre o desempenho, microestrutura intestinal, barreiras imunológicas e modulação da microbiota intestinal de frangos de corte.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N. Probióticos e correlatos na produção avícola. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 15, p. 225-248.
- ANNAS, M. I.; PUPA, J. M. R. Enzimas: uma alternativa viável para enfrentar a crise na suinocultura. **Revista PorkWorld**, Ano 2, n. 13, p. 48-51, 2003.
- ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasília**, v. 1, n. 3, p. 69-77, 2007.
- BALLOU, C. E. A Study of the Immunochemistry of Three Yeast Mannans. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 245, n. 5, p. 1197-1203, 1970.
- BIGGS, P.; PARSONS, C. M.; FAHEY, G. C. The Effects of Several Oligosaccharides on Growth Performance, Nutrient Digestibilities, and Cecal Microbial Populations in Young Chicks. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2327-2336, 1 nov. 2007.
- BORNET, F.R.J. Non digestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p.7635-7695, 1994.
- CAO, B. H.; KARASAWA, Y.; GUO, Y. M. Effects of Green Tea Polyphenols and Fructo-oligosaccharides in Semi-purified Diets on Broilers` Performance and Caecal Microflora and Their Metabolites. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 1, p. 85-89, 19 abr. 2005.
- CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415-1422, 1 ago. 2013.
- COLLET, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: Ronda Latino-americana Alltech: O futuro da alimentação. **Alltech Biotechnology**, Campinas, 20-30, 2000.
- CUMMINGS J.H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 6, p. 145-151, 1 maio 2002.
- DREYON, T.; BORNET, F. Lês FOS: ACTILIGHT. In: MULTON, J. L. (Ed.). **Le sucre, les sucres, les edulcorants et les glucides de charges dans les IAA**. Paris: Tec & DOC Lavoisier, 1992. p. 313-338.
- DUEÑAS, M.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; CUEVA, C.; JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; SANTOS-BUELGA, C.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOMÉ, B. A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-15, 22 fev. 2015.
- ELANGOVAN, A. V.; MANDAL, A. B.; YADAV, A.S; PRAMOD, K. T.; TYAGI PRAVEEN, K. Influence of mannan-oligosaccharide on the performance of broilers. **Ind. J. Anim. Nutr.**, 22: 129-131, 2005.
- FAGUNDES, R.L.M.; COSTA, Y.R. Uso de alimentos funcionais na alimentação. **Higiene Alimentar**, v.17, n. 108, p.42-48, 2003.

- FASCINA, V. B. Aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos em dietas de frangos de corte. 2011. 175f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2011.
- FECHNER, A.; FENSKE, K.; JAHREIS, G. Effects of legume kernel fibres and citrus fibre on putative risk factors for colorectal cancer: a randomised, double-blind, crossover human intervention trial. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 1, p. 101, 16 dez. 2013.
- FERKET, P. R. Controlling Gut Health without the Use of Antibiotics. [s.d.]
- FLEMMING, J. S. et al. RAÇÃO FARELADA COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS EM FRANGOS DE CORTE (Use of mashed rations with different particle sizes for broilers). **Archives of Veterinary Science**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2002.
- FLEMMING, J. S. Utilização de leveduras, probióticos e mananoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frangos de corte. 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPOSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriú, Santa Catarina. **Anais...** Balneário Camboriú, 2004, p. 6-28.
- GIBSON G. R.; WILLIS C. L.; VAN LOO J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria implications for health. **International Sugar Journal**, v.96, p.1150-1156, 1994.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–12, jun. 1995.
- GOTO, K.; KATSUHITO, F.; HIKIDA, J.; NANJO, F.; HARA, Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.59, n.12, p.2346-2347, 1995.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens. **Avian Diseases**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 972, 1983.
- HERFEL, T. M.; JACOBI, S. K.; LIN, X.; FELLNER, V.; WALKER, D. C.; JOUNI, Z. E.; ODLE, J. Polydextrose Enrichment of Infant Formula Demonstrates Prebiotic Characteristics by Altering Intestinal Microbiota, Organic Acid Concentrations, and Cytokine Expression in Suckling Piglets. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 12, p. 2139–2145, 1 dez. 2011.
- HUANG, C. H.; CHENG, J. Y.; DENG, M. C.; CHOU, C. H.; JAN, T. R. Prebiotic effect of diosgenin, an immunoactive steroidal sapogenin of the Chinese yam. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 428–432, 1 maio 2012.
- IJI, P. A.; TIVEY, D. R. Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. **World's Poultry Science Journal**, v. 54, n. 02, p. 129–143, 18 jun. 1998.
- JUNG, S. J.; HOUDE, R.; BAURHOO, B.; ZHAO, X.; LEE, B. H. Effects of Galacto-Oligosaccharides and a Bifidobacteria lactis-Based Probiotic Strain on the Growth Performance and Fecal Microflora of Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 87, n. 9, p. 1694–1699, 1 set. 2008.

- JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE, K. F.. Resultados de pesquisa com aditivos alimentados no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 52., Goiânia, GO, p. 169-182, 2005.
- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002.
- KLASING, K. C. Avian gastrointestinal anatomy and physiology. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 42–50, 1999.
- KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 05, p. 597, 9 maio 2003.
- KOGUT, M. H.; KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 1, p. 103–110, 1 jan. 2009.
- KORE, K. B.; PATTANAIK, A. K.; DAS, A.; SHARMA, K. Evaluation of Alternative Cereal Sources in Dog Diets: Effect on Nutrient Utilisation and Hindgut Fermentation Characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 13, p. 2174–2180, 2009.
- KULLEN, M. J.; KHIL, J.; BUSTA, F. F.; GALLAHER, D. D.; BRADY, L. J. Carbohydrate source and bifidobacteria influence the growth of *Clostridium perfringens* in vivo and in vitro. **Nutrition Research**, v. 18, n. 11, p. 1889–1897, 1 nov. 1998.
- LEE, Y. K. (Yuan K.); SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and prebiotics**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2009.
- LESLIE, A. J. The ever-increasing role of biotechnology in the poultry industry: lessons from the past and thoughts for the future. **North American University Tour**, 1996, p. 65-85.
- LODDI, M. M. Probióticos, prebióticos e acidificantes orgânicos em dietas para frangos de corte. 2003. 52 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 1. ed. Jaboticabal: FUNESP/UNESP, 1994. 296 p.
- MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2000, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. v. 2, p. 455-457.
- MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 318, n. 7189, p. 999–1003, 1999.
- MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, 4 set. 2007.

- MACFARLENE, G. T.; STEED, H.; MACFARLENE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 104, n. 2, p. 305-344, 2008.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.3, p.631-650. 2008.
- MAIORKA, A. Adaptações digestivas pós-eclosão. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Santos, São Paulo. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001. v. 2, 141-151.
- MCFARLANE, J. M. et al. Multiple Concurrent Stressors in Chicks.: 2. Effects on Hematologic, Body Composition, and Pathologic Traits. **Poultry Science**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 510–521, 1989.
- MIKKELSEN, L. L.; JAKOBSEN, M.; JENSEN, B. B. Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets post-weaning. **Animal Feed Science and Technology**, v. 109, n. 1–4, p. 133–150, 3 out. 2003.
- MODESTO, M.; D'AIMMO, M. R.; STEFANINI, I.; TREVISI, P.; DE FILIPPI, S.; CASINI, L.; MAZZONI, M.; BOSI, P.; BIAVATI, B. A novel strategy to select Bifidobacterium strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. **Livestock Science**, v. 122, n. 2–3, p. 248–258, 1 jun. 2009.
- MUNJ, C. P.; RANADE, A. S.; DESAI, D. N.; AVARI, P.E.; PATIL U. M.; METAKARI D.M. Studies on synergistic effects of certain common feed additives on carcass quality, intestinal pH and gut microflora in broilers. **Indian Journal of Animal Nutrition.**, v. 27, p. 93-95, 2010.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.
- NAVIDSHAD, B.; LIANG, J. B.; JAHROMI, M. F.; AKHLAGHI, A.; ABDULLAH, N. A comparison between a yeast cell wall extract (Bio-Mos®) and palm kernel expeller as mannan-oligosaccharides sources on the performance and ileal microbial population of broiler chickens. **Italian Journal of Animal Science.**, v. 14, n. 10, 2015.
- NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos – Moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 28, n. 163, p. 34-38, 2000.
- NINESS K.R. Inulin and oligofructose. What are they? **Journal of Nutrition**, v.129, p.1402s-1406s, 1999.
- OBA, A.; LOPES, P. C. F.; BOIAGO, M. M.; SILVA, A. M. S.; MONTASSIER, H. J.; DE SOUZA, P. A. Características produtivas e imunológicas de frangos de corte submetidos a dietas suplementadas com cromo, criados sob diferentes condições de ambiente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 5, p. 1186–1192, 2012.
- O'CONNELL, J.M.; CALLAN, J.J.; O'DOHERTY, J.V. The interaction between cereal type and lactose level on piglet performance and diet digestibility post weaning. **Animal Science**, v. 81, p. 265-269, 2005.

- OLÁH, I.; VERVELDE, L. Structure of the avian lymphoid system. In: DAVISON, F.; BERND, K. SCHAT, K.A. **Avian Immunology**. London: Elsevier. cap. 2, p. 13-50, 2008.
- PAWAR, M. M.; PATTANAIK, A. K.; SINHA, D. K.; GOSWAMI, T. K.; SHARMA, K. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of animal science and technology**, v. 59, p. 11, 2017.
- PESSELA, B. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sephabeads supports decreases product inhibition: complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v. 33, n. 2-3, p. 199-205, 2003.
- PRÉSTAMO, G.; PEDRAZUELA, A.; PEÑAS, E.; LASUNCIÓN, M. A.; ARROYO, G. Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food. **Nutrition Research**, v. 23, n. 6, p. 803–814, 1 jun. 2003.
- QUINTEROS, E.T.T. Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de Yacon. Campinas, 2000. 96 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RAMNANI, P.; CHITARRARI, R.; TUOHY, K.; GRANT, J.; HOTCHKISS, S.; PHILP, K.; CAMPBELL, R.; GILL, C.; ROWLAND, I. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 1–6, fev. 2012.
- RAMOS, L. de S. N.; LOPES, J. B.; SILVA, S. M. M. de S.; SILVA, F. E. S.; RIBEIRO, M. N. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1738–1744, ago. 2011.
- RIBEIRO, R. P.; FLEMMING, J. S.; BACILA, A. R. USO DE LEVEDURAS (*Saccharomyces cerevisiae*), Parede Celular De Leveduras (Sscw), Ácidos Orgânicos E Avilamicina Na Alimentação De Frangos De Corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, 30 set. 2008.
- RUIZ-HERRERA, J. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly. CRC Press, Boca Raton, FL. Medzhitov, R., Janeway Jr., C., 2000. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**. v.343, p.338–344, 1992.
- SAMAL, L.; CHATURVEDI, V. B.; PATTANAIK, A. K. Jerusalem Artichoke as a Potential Prebiotic: Influence on Nutrient Utilization, Hindgut Fermentation and Immune Response of Labrador Dogs. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 12, p. 343-352, 2012.
- SAMAL, L.; CHATURVEDI, V. B.; SAIKUMAR, G.; SOMVANSHI, R.; PATTANAIK, A. K. Prebiotic potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in Wistar rats: effects of levels of supplementation on hindgut fermentation, intestinal morphology, blood metabolites and immune response. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 8, p. 1689–1696, jun. 2015.
- SAMARASINGHE, K.; WENK, C.; SILVA, K. F. S. T.; GUNASEKERA, J. M. D. M.

- Turmeric (*Curcuma longa*) root powder and mannanoligosaccharides as alternatives to antibiotics in broiler chicken diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1495–1500, 1 jan. 2003.
- SANTOS JÚNIOR, A. A. et al. Reduction of intestinal *Salmonella* spp. Colonization in turkeys by dietary wheat, triticale and enzyme supplementation. In: Annual of Meeting of the Southern Poultry Science Society, 25f, 2005, **Anais...** Atlanta. 2005.
- SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803–808, jun. 2007.
- SAVAGE, T.F.; COTTER, P.F.; ZAKRZEWSKA, E.I. The effects of feeding a mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of Wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, v.75, suppl.1, p.143, 1996.
- SHANE, S. M. Mannan oligosaccharides in poultry nutrition: mechanisms and benefits. In: INTERNATIONAL FEED INDUSTRY SYMPOSIUM, 17 Lexington. **Proceedings...**Lexington: Alltech, 2001. p. 65-77,2001.
- SHASHIDHARA, R.; DEVEGOWDA, G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poultry Science**, v. 82, n. 8, p. 1319–1325, 1 ago. 2003.
- SHEEHY, P. J. A.; MORRISSEY, P. A. Functional foods: prospects and perspectives. In: HRNRY, C. J. A.; HEPPELL, N. J. **Nutritional aspects of food processing and ingredients**. Gaithersburg: Aspen, 1998. p. 45-65.
- SILVA, E. N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000, v. 2, p. 241-251.
- SILVA, L. P. da; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 983–990, out. 2003.
- SILVA, V. K.; DA SILVA, J. D. T.; TORRES, K. A. A.; DE FARIA FILHO, D. E.; HADA, F. H.; DE MORAES, V. M. B. Humoral immune response of broilers fed diets containing yeast extract and prebiotics in the prestarter phase and raised at different temperatures. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 3, p. 530–540, 1 jan. 2009.
- SPIEGEL, J.E.; ROSE, R.; KARABELL, P. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, Boston, v.48, p.85-89, 1994.
- SPRING, P. Efeito da inclusão de mananoligossacarídeo na dieta sobre o desempenho de matrizes e leitões. **Swiss College of Agriculture**, Zollikofen, Suíça. 2004.
- SPRING, P. Yeast's secret weapon aids animal production. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 41-50.
- STRICKLING, J. .; HARMON, D. .; DAWSON, K. .; GROSS, K. . Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3–4, p. 205–219, 30 ago. 2000.

- TANAKA, R.; MATSUMOTO, K. Recent progress on prebiotics in Japan, including galacto-oligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v.336, p.1488s-1491s, 1998.
- THITARAM, S. N.; CHUNG, C.-H.; DAY, D. F.; HINTON, A.; BAILEY, J. S.; SIRAGUSA, G. R. Isomaltooligosaccharide Increases Cecal Bifidobacterium Population in Young Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 84, n. 7, p. 998–1003, 1 jul. 2005.
- UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Development of the small intestine in heavy and light strain chicks before and after hatching. **British Poultry Science**, v. 37, n. 1, p. 63–71, mar. 1996.
- VOGT, L. K. Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte. 2005. 160f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- WALKER, W. A.; DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, n. 12, p. 668–675, 1 dez. 1998.
- XU, Z.; HU, C.; XIA, M.; ZHAN, X.; WANG, M. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 6, p. 1030–1036, 1 jun. 2003.
- YUN, J.W. Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.
- YUSRIZAL; CHEN, T. C. Effect of adding chicory fructans in feed on fecal and intestinal microflora and excreta volatile ammonia. **International Journal of Poultry Science**, v. 2, n. 3, p. 188–194, 1 mar. 2003.

CAPÍTULO II

**DESEMPENHO, SAÚDE, AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA E
MICROBIOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM
PREBIÓTICOS EM DIFERENTES PROPORÇÕES**

Resumo. Neste estudo, 1250 pintos de corte machos, linhagem ROSS AP95, foram casualmente distribuídos em 5 tratamentos, com 10 unidades experimentais cada, objetivando testar diferentes proporções de mananos com β -glucanos e frutoligosacarídeos com galactoligosacarídeos, combinados e incluídos em dietas de frangos de corte. Os tratamentos consistiram de: CP, dieta basal (DB)+AMD; DB+BUT, DB+Butirato de Cálcio; GM1/3+FG2/3: DB + GLUCANMOS (1/3 da mistura) : FOS:GOS (2/3 da mistura); GM1/2+FG1/2: DB + GLUCANMOS (1/2 da mistura) : FOS:GOS (1/2 da mistura); GM2/3+FG1/3: DB + GLUCAN MOS (2/3 da mistura) : FOS:GOS (1/3 da mistura). Foram avaliados o desempenho, peso relativo de órgãos, integridade de vilosidades, densidade de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais, histomorfometria de Bursa de Fabricius e contagem diferencial de leucócitos no sangue, ainda, foi determinada a produção de ácidos graxos de cadeia curta nos cecos e realizada contagem de unidades formadoras de colônias de *E. coli* e teste da atividade inibitória *in vitro* das substâncias antagônicas produzidas pelas amostras do *pool* de bactérias ácido lácticas cecais frente à *Salmonella enterica* serovar Heidelberg. Os dados foram submetidos a ANOVA seguida de teste de médias de Tukey (5%), as contagens sanguíneas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis (5%). Os resultados demonstram não existir interferência dos prebióticos na eficiência produtiva das aves ao final do período produtivo, permitindo recomendar a substituição dos AMD pelas combinações avaliadas sem prejuízo ao desempenho.

Palavras-chave: AGCC, Antibiótico, FOS, GOS, MOS, *Salmonella*.

**PERFORMANCE, HEALTH, HISTOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL
ASSESSMENT OF BROILER CHICKENS FED PREBIOTICS IN DIFFERENT
PROPORTIONS**

Abstract. In this study, 1250 male ROSS AP95 day-old chicks were randomly distributed in 5 treatments, with 10 experimental units each, aiming to test different proportions of mannan with β -glucans and fructooligosaccharides with galactooligosaccharides, combined and included in broiler diets. Treatments consisted of: PC, basal diet (BD) + performance enhancer antibiotic (PEA); BD + BUT: BD + Calcium Butyrate; GM1 / 3 + FG2 / 3: BD + GLUCANMOS (1/3 of the blend): FOS: GOS (2/3 of the blend); GM1 / 2 + FG1 / 2: BD + GLUCANMOS (1/2 of the blend): FOS: GOS (1/2 of the blend); GM2 / 3 + FG1 / 3: BD + GLUCAN MOS (2/3 of the blend): FOS: GOS (1/3 of the blend). The performance, relative organ weight, villi integrity, goblet cells and intraepithelial lymphocytes density, Bursa of Fabricius histomorphometry and differential leukocyte count in blood were evaluated. The production of short chain fatty acids in the cecum was determined as well as colony-forming units counting of *E. coli* and *in vitro* test of inhibitory activity of antagonistic substances produced by the samples of the cecal lactic acid bacteria against *Salmonella enterica* serovar Heidelberg. Data were submitted to ANOVA followed by a Tukey means test (5%); blood counts were submitted to Kruskal-Wallis test (5%). Results show that there is prebiotic interference in productive efficiency of birds up to 21 days of age; at the end of the productive period, there are no differences in the performance of birds with or without prebiotics. The results allow us to recommend the replacement of PEA by prebiotics combinations without performance impairment.

Key words: Antibiotic, FOS, GOS, MOS, *Salmonella*, SCFA

1. INTRODUÇÃO

O avanço nas pesquisas e a utilização de aditivos nas dietas sem dúvida foi um dos fatores que mais contribuiu para o aumento da produtividade na avicultura. Os antibióticos ainda são amplamente utilizados na produção animal, seja como medida terapêutica ou profilática na intenção de melhorar o desempenho animal, e é inegável sua contribuição na manutenção de níveis mais altos de produtividade. Os antibióticos como melhoradores de desempenho (AMD) atuam principalmente sobre a microbiota intestinal, favorecendo o seu equilíbrio, assim, há a redução da competição por nutrientes entre a microbiota e o animal e a redução da atividade de patógenos (ANDERSON et al., 1999) elevando o status sanitário do intestino de maneira geral.

Entretanto, o uso dos antibióticos como melhoradores de desempenho levou à preocupação do mercado consumidor e pressão de agências reguladoras com riscos relacionados à seleção de bactérias patogênicas multirresistentes aos antibióticos usados na terapêutica humana. Assim, já em 2006, diversas moléculas antibióticas tiveram seu uso proibido na União Europeia (EC REGULATION n.1831/2003).

Visando a necessidade de manutenção da produção e de mercados consumidores, juntamente com a preocupação com quadros de toxi-infecção causados por bactérias patogênicas, houve a necessidade na busca de produtos alternativos capazes de proporcionar melhor desempenho para os animais, diminuir a contaminação das carcaças por bactérias patogênicas, sem riscos da presença de resíduos nocivos que possam causar problemas de saúde aos consumidores da carne do frango. Surge então como alternativa a utilização de prebióticos; oligossacarídeos não digestíveis pelas aves mas fermentáveis pela microbiota intestinal desejável, que tem demonstrado eficiência na modulação benéfica da microbiota intestinal, e conseqüentemente na resposta imunológica e no desempenho zootécnico da ave sem riscos de contaminar o produto final (AMMERMAN et al., 1989).

A utilização de moléculas funcionais na nutrição animal tem potencial benéfico aos sistemas imune e desempenho das aves, entretanto, é necessário melhor entendimento dos benefícios destas na saúde dos animais, bem como quais combinações destes substratos fermentativos podem trazer efeitos adicionais à produtividade.

2. OBJETIVO

Este experimento objetivou determinar a proporção adequada da combinação de mananos com β -glucanos e frutoligossacarídeos com galactoligossacarídeos a ser incluída nas dietas de frangos de corte visando produtividade e saúde, baseado no efeito desta sobre o desempenho, microestrutura intestinal, barreiras imunológicas e modulação da microbiota intestinal das aves.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

Foram alojados 1250 pintos de corte, machos, da linhagem ROSS AP95, vacinados no incubatório contra doença de Marek e Gumboro. As aves foram distribuídas em 50 boxes de 2,0 m² com 25 aves por boxe, munidos de comedouros tipo tubular e bebedouros tipo nipple, em aviário de pressão negativa do Laboratório de Nutrição de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Campus de Botucatu.

A cama, de 10 cm de espessura, foi reutilizada por três lotes consecutivos, afim de simular os desafios das condições de campo.

Água e ração foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental, o programa de luz seguiu as orientações do manual da linhagem de frangos selecionada.

As aves foram distribuídas em blocos casualizado com cinco tratamentos e dez repetições cada. Os tratamentos foram:

- CP: dieta basal (DB) +AMD;
- DB+BUT: DB + Butirato de Cálcio;
- GM1/3+FG2/3: DB + GLUCANMOS (1/3 da mistura) : FOS:GOS (2/3 da mistura);
- GM1/2+FG1/2: DB + GLUCANMOS (1/2 da mistura) : FOS:GOS (1/2 da mistura);
- GM2/3+FG1/3: DB + GLUCAN MOS (2/3 da mistura) : FOS:GOS (1/3 da mistura).

Todas as dietas experimentais utilizadas (Tabela 1) foram isoenergéticas, isoproteicas e isoaminoacídicas, de acordo com as recomendações nutricionais propostas por Rostagno et al. (2011) para frangos de corte de desempenho médio, e divididas em quatro

fases: pré-inicial (1 – 7 dias), inicial (8 – 21 dias), crescimento (22 – 35 dias) e final (36 – 42 dias).

Os prebióticos utilizados foram obtidos de indústria especializada e sua inclusão se deu em detrimento do material inerte das dietas na proporção de 0,2% da dieta total.

Tabela 1. Composição centesimais e nutricionais das dietas experimentais.

	Pré-Inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho, Grão Moído	54,516	58,604	61,145	66,218
Farelo de Soja, 45%	38,423	34,915	31,715	27,444
Óleo de Soja	2,388	2,368	3,383	3,084
DL-Metionina (99%)	0,355	0,284	0,254	0,237
L-Lisina HCl (78,4%)	0,277	0,209	0,186	0,226
L-Treonina (98,5%)	0,103	0,057	0,039	0,047
Fosfato Bicálcico	1,907	1,508	1,273	1,070
Calcário Calcítico	0,913	0,923	0,864	0,770
Sal Comum	0,306	0,199	0,095	0,444
Bicarbonato de Sódio	0,297	0,416	0,532	0,000
Premix Vitamínico ¹	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Mineral ²	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de Colina	0,060	0,060	0,060	0,060
Anticoccidiano ³	0,055	0,055	0,055	0,000
Inerte	0,200	0,200	0,200	0,200
Composição Nutricional Calculada				
EM (kcal/kg)	2950	3000	3100	3150
PB (%)	22,20	20,80	19,50	18,00
Cálcio (%)	0,920	0,819	0,732	0,638
Fósforo disponível (%)	0,470	0,391	0,342	0,298
Metionina dig. (%)	0,645	0,561	0,517	0,485
Metionina+cistina dig. (%)	0,944	0,846	0,787	0,737
Lisina dig. (%)	1,310	1,174	1,078	1,010
Treonina dig. (%)	0,852	0,763	0,701	0,656
Cloro, %	0,234	0,171	0,109	0,318
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195
Potássio (%)	0,861	0,809	0,758	0,694
Ácido Linoleico (%)	2,671	2,707	3,274	3,172

¹Premix vitamínico para frangos de corte (BRNova®), níveis de garantia por kg de produto: Vit. A, 9.000.000 UI; Vit. D3, 2.500.000 UI; Vit. E, 14.000 UI; Ácido Fólico, 1.000 mg; Ácido Pantotênico, 15 mg; Niacina, 40 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B2, 6.200 mg; Vit. B1, 2.500 mg; Vit. B12, 14.000 µg; Vit. K3, 2.000 mg; B.H.T., 100 mg.

²Premix vitamínico para frangos de corte (BRNova®), níveis de garantia por kg de produto: Fe, 50 g; Cu, 10 g; Mn, 80 mg; Zn, 60 g; I, 1.200 mg; Se, 200 mg.

3.2. Variáveis Analisadas

3.2.1. Desempenho

Todas as aves de cada parcela experimental foram pesadas aos 7, 21, 35 e 42 dias para a determinação do peso corporal, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar. Ao final do período experimental foi calculada a viabilidade baseada no controle diário de mortalidade e o fator de eficiência produtiva pela seguinte fórmula:

$$FEP = (\text{Peso Corporal} \times \text{Viabilidade}) / (\text{Conversão Alimentar} \times \text{Idade de Abate}) \times 100$$

3.2.2. Peso Relativo de Órgãos

Aos 21 e 42 dias de idade, foi retirada uma ave no peso médio de cada unidade experimental, pesada e eutanasiada após jejum de duas horas, para posterior coleta e pesagem de fígado, proventrículo, moela, intestino delgado, pâncreas, baço e Bursa de Fabrícus. Os dados foram utilizados para o cálculo dos pesos relativos em relação ao peso corporal da ave em jejum.

3.2.3. Barreiras Físicas do Intestino Delgado

Foram coletados fragmentos de duodeno, jejuno e íleo para análises histomorfométricas de uma ave por unidade experimental aos 21 e 42 dias de idade. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% por 24 horas e em seguida armazenadas em álcool 70%. Para a confecção das lâminas histológicas, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool (álcool 70%; 80%; 90%; 100%; 100%; 100%) por 30 minutos por passagem. Posteriormente diafanizadas em solução álcool: xilol (1:1) por 30 minutos e xilol 100% por 30 minutos, imersas em Paraplast® (parafina) em estufa a 55°C por 90 minutos e, incluídas em Paraplast® para formação dos blocos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à microtomia obtendo-se corte histológicos de cinco micrômetros de espessura, os quais foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina.

A altura dos vilos e profundidade das criptas dos segmentos intestinais foram determinadas por meio de imagens, obtidas em microscópico óptico com objetiva

planapocromática 10X. As imagens foram capturadas com câmera acoplada ao microscópio e transferidas para um analisador de imagem (Leica Application Suite 3.5). Vinte leituras de altura de vilos e profundidade de cripta foram realizadas por lâmina e por segmento intestinal, que corresponde a uma ave por parcela experimental. A altura de vilos foi medida da região apical à região basal, que corresponde à porção superior das criptas. As criptas foram medidas da base até a região de transição entre a cripta e o vilos.

3.2.4. Barreiras Imunológicas do Intestino Delgado

3.2.4.1. Linfócitos Intraepiteliais Intestinais (IEL)

A densidade de linfócitos intraepiteliais intestinais (IEL) foi determinada em cada lâmina nos três segmentos do intestino delgado. Uma imagem foi obtida em câmera acoplada a microscópio ótico com objetiva de 20x e analisada pelo software Leica Application Suite 3.5. Em uma área delimitada e conhecida foi realizada contagem total dos linfócitos intraepiteliais, sendo os resultados expressos em número de células por unidade de área em milímetros quadrados.

3.2.4.2. Células Caliciformes (Gc)

De cada lâmina dos três segmentos intestinais, uma imagem foi obtida em câmera acoplada a microscópio ótico com objetiva de 20x. A imagem foi segmentada pelo procedimento de *threshold* do *software* Adobe Photoshop® CC (2018) e analisada pelo *software* Leica Application Suite 3.5. Em uma área delimitada e conhecida foi realizada contagem total das células caliciformes, sendo os resultados expressos em número de células por unidade de área em milímetros quadrados.

3.2.5. Histomorfometria de Bursa de Fabrícus

Foi coletada a Bursa de Fabrícus de uma ave por unidade experimental, aos 21 e 42 dias, e fixadas em formol a 10% neutro tamponado. A confecção das lâminas histológicas seguiu os mesmos procedimentos adotados para os fragmentos de intestino. Foram analisados 15 folículos completos por lâmina, correspondente a uma ave por parcela experimental. Foram escolhidos para leitura, folículos em que o corte passou pela região central. Cada folículo selecionado foi circundado por uma linha, obtendo-se a área

folicular total e, em seguida, delimitada a porção medular do mesmo folículo, passando uma linha sobre a membrana basal que divide a área cortical da medular para cálculo da porcentagem de córtex folicular.

3.2.6. Contagem Diferencial de Leucócitos e Relação Heterofilo/Linfócito

Para a contagem de leucócitos e relação heterofilo: linfócito, foram coletados 2mL de sangue de uma ave por unidade experimental, por meio de punção da veia ulnar com seringa heparinizada. Imediatamente após a coleta, extensões sanguíneas foram preparadas e armazenadas para serem coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A contagem foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100x, conforme metodologia proposta por Charles Noriega (2000).

3.2.7. Microbiologia Cecal

Foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) de *E. coli*, bem como o teste da atividade inibitória *in vitro* das substâncias antagônicas produzidas pelas amostras de Lactobacilos cecais frente à *Salmonella enterica* serovar Heidelberg.

Para tanto, um dos cecos de uma ave por unidade experimental foi removido assepticamente logo após o abate da ave, sendo posteriormente acondicionado em bolsa plástica estéril e homogeneizado com PBS na proporção de 1:10, obtendo-se diluição 10^{-1} . Foram realizadas diluições seriadas até 10^{-10} em microtubos graduados contendo PBS, com posterior plaqueamento de 0,1 mL em meio Ágar MacConkey, as placas foram incubadas durante 24 horas à temperatura de 37°C. O número de UFC/grama de conteúdo cecal obtido foi convertido em \log_{10} para interpretação dos resultados.

Um *pool* de bactérias ácido lácticas cecais foi obtido através do plaqueamento em meio MRS Ágar e preservado em nitrogênio líquido (caldo MRS + glicerina PA 30%) para avaliação de halo de inibição.

A atividade inibitória das substâncias antagônicas produzidas pelas amostras de bactérias ácido lácticas cecais frente à *S. enterica* foi mensurada utilizando-se o método de antagonismo “*Spot on the lawn*”, de acordo com Harris et al. (1989).

As amostras do *pool* de bactérias ácido lácticas foram reativadas em Caldo MRS, através de incubação a 38°C por 24 horas. Após esse período, três alíquotas de 10 µL de cada amostra experimental foram posicionadas de forma equidistante sobre placas de Petri estéreis, preparadas previamente com meio de cultura MRS Ágar, e novamente incubadas por 18 horas a 38°C.

Paralelamente, foram preparados tubos graduados tipo *falcon*, com tampa, contendo 5 mL do meio caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) que acondicionaram amostras do microrganismo indicador (*S. enterica* serovar Heidelberg), proveniente da Bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da Unesp/Botucatu. Estes tubos foram levados à estufa para que os microrganismos fossem reativados através de incubação a 38°C por 12 horas. Momentos antes da finalização das incubações foram preparados, ainda, tubos graduados contendo 15 mL do meio BHI com 0,7% de Ágar, para acondicionarem as amostras de *S. enterica* reativadas.

Em cada tubo contendo 15 mL de Ágar BHI foi adicionada uma alíquota de 150 µL da amostra semeada do microrganismo indicador, sendo logo após mantidos em banho maria a 45°C para equilibrar temperaturas. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi cuidadosamente vertido nas placas incubadas com as amostras de bactérias ácido lácticas em pontos equidistantes. Após completa secagem e solidificação da camada de BHI + *Salmonella*, as placas foram incubadas a 38°C por 24 horas.

O antagonismo foi detectado pela presença de zonas/halos de inibição ao redor das culturas de bactérias ácido lácticas e mensurados em milímetros em *software* de processamento de imagens (Leica Application Suite 3.5).

3.2.8. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta nos cecos

Aos 42 dias de idade, foi coletado um grama de conteúdo cecal e posteriormente diluído em 2mL de ácido fórmico (17%). Após centrifugação a $12.000 \times g$ a 4° C por 10 minutos, o sobrenadante (2mL) foi submetido à análise por cromatografia a gás para determinação da concentração dos ácidos acético, butírico e propiônico (ERWIN et al., 1961). As análises foram feitas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FVMZ, USP, Campus de Pirassununga, SP.

3.3. Avaliação Estatística

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$), através do procedimento de Modelo Linear Generalizado (GLM) do software estatístico Minitab® (Minitab Versão 18, Minitab Inc., State College, PA, 2017). Os índices de colonização bacteriana cecal sofreram transformação logarítmica (Log_{10} UFC) para que os mesmos fossem modulados por uma distribuição normal.

Os parâmetros sanguíneos, demais dados nominais e de distribuição desconhecida, não sofreram transformação e foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, no mesmo *software* estatístico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de desempenho estão expostos na tabela 2. Não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos períodos avaliados.

Ganhos de peso similares aos antibióticos em resposta ao uso de promotores de crescimento biológicos na avicultura já são relatados desde a década de 1980 (WATKINS; KRATZER, 1983) embora geralmente o resultado de antibióticos seja mais consistente em virtude da constância de composição, pureza e modo de ação.

Aos ácidos orgânicos, como Butirato, são atribuídos efeitos antibacterianos à semelhança dos antibióticos, principalmente para ácidos orgânicos de cadeia curta, sendo particularmente efetivos contra *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter* (DIBNER e BUTTIN, 2002; RICKE, 2003).

Os resultados de experimentos com aditivos equilibradores da flora podem ser conflitantes, visto que as condições experimentais nem sempre representam de maneira fiel, o que ocorre no campo. Em um galpão experimental as condições ambientais e estruturais geralmente são melhores, ocorre maior higiene de pessoal e equipamentos, menor desafio sanitário, melhor manejo das aves e maior tempo de vazio sanitário das instalações (FLEMMING, 2005).

Tabela 2. Desempenho de frangos de corte recebendo dietas contendo diferentes combinações de prebióticos.

Variável	1 a 7 dias					P value	CV ⁵ (%)
	CP ¹	DB+BUT ²	GM ³ 1/3 +FG ⁴ 2/3	GM1/2 +FG1/2	GM2/3 +FG1/3		
PMI (g)	45,85	45,77	45,62	45,92	45,46	0,3680	1,23
PMF (g/ave)	155,66	155,47	153,48	153,48	151,12	0,6280	4,59
GP (g)	105,27	109,77	107,86	109,74	108,02	0,6350	6,54
GPD (g/dia/ave)	15,04	15,68	15,41	15,68	15,43	0,6350	6,54
CR (g/ave)	138,30	135,23	137,89	137,63	137,58	0,8690	4,82
CA (g/g)	1,32	1,25	1,31	1,25	1,27	0,3140	7,55
Viabilidade (%)	99,62	99,62	98,85	99,20	99,20	0,7800	1,53
1 a 21 dias							
PMF (g/ave)	917,69	924,20	932,91	937,30	914,00	0,5170	3,68
GP (g)	871,85	878,40	887,30	891,30	868,50	0,5260	3,88
GPD (g/dia/ave)	41,52	41,83	42,25	42,45	41,36	0,5260	3,88
CR (g/ave)	1187,80	1210,10	1208,90	1205,20	1195,95	0,6420	3,10
CA (g/g)	1,41	1,38	1,37	1,35	1,35	0,5030	6,25
Viabilidade (%)	100,00	98,72	99,23	98,85	98,46	0,2830	1,69
1 a 35 dias							
PMF (g/ave)	2418,60	2447,70	2426,90	2445,20	2458,70	0,8070	3,20
GP (g)	2372,80	2401,90	2381,30	2399,20	2413,30	0,8030	3,25
GPD (g/dia/ave)	67,79	68,63	68,04	68,55	68,95	0,8030	3,25
CR (g/ave)	3536,60	3495,70	3573,00	3609,70	3527,70	0,5910	4,60
CA (g/g)	1,52	1,48	1,52	1,54	1,48	0,3560	4,75
Viabilidade (%)	94,62	96,54	96,92	94,62	93,08	0,0740	3,63
1 a 42 dias							
PMF (g/ave)	2756,60	2894,00	2808,60	2823,00	2780,50	0,5490	6,62
GP (g)	2710,80	2848,20	2763,00	2777,10	2735,00	0,5500	6,74
GPD (g/dia/ave)	64,54	67,82	65,78	66,12	65,12	0,5500	6,74
CR (g/ave)	5059,50	5038,20	5099,20	5153,70	5075,70	0,3160	2,52
CA (g/g)	1,89	1,85	1,87	1,90	1,87	0,6040	3,42
Viabilidade (%)	94,23	93,46	95,38	94,23	94,23	0,8540	3,89
FEP ⁶	329,70	348,02	340,69	333,73	332,62	0,5960	8,18

PMF, peso médio final; GPD, ganho de peso diário; CR, consumo de ração; CA, conversão alimentar; FEP, fator de eficiência produtiva.

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com adição de Butirato de Cálcio; ³mananos e β -glucanos; ⁴frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁵CV, coeficiente de variação; ⁶FEP = $(\text{Peso Corporal} \times \text{Viabilidade}) / (\text{Conversão Alimentar} \times \text{Idade de Abate}) \times 100$

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

Ainda que o desempenho das aves seja variável de caráter multifatorial, e as condições ambientais influenciam grandemente o consumo e conseqüentemente o ganho de peso das aves, a similaridade no desempenho permite inferir que os modos de ação dos aditivos estudados se assemelham, permitindo desempenho satisfatório a dispor do composto de escolha.

Ao e Choct (2013) ainda relatam que, embora tenham observados melhoras na conversão alimentar de aves alimentadas com FOS e MOS até os 35 dias de idade, esses contrastes em relação ao controle tendem a desaparecer a o final do ciclo produtivo ou tornarem-se menos aparentes. Isso sugere que a suplementação de oligossacarídeos pode ser mais eficiente e com efeitos mensuráveis apenas nas primeiras semanas de vida das aves, sendo a semelhanças de resultados em relação aos controles um efeito já esperado.

A tabela 3 contém os dados calculados de peso relativo de órgãos aos 21 e 42 dias de idade. Apenas no primeiro período avaliados diferenças estatísticas foram encontradas, o CP apresentou maior peso de intestino delgado, os tratamentos prebióticos inferiram menor peso com exceção de GM2/3 +FG1/3. Diferenças no proventrículo também foram observados no mesmo período, a dieta com ácido orgânico difere de GM1/3 +FG2/3 e GM1/2 +FG1/2 com maior peso.

O intestino delgado dos pintos de um dia é imaturo e sofre alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares que perduram por duas semanas após a eclosão, sendo o início da vida pós-eclosão da ave o período em que ocorrem as alterações mais drásticas (GEYRA; UNI; SKLAN, 2001). O desenvolvimento da mucosa intestinal das aves consiste basicamente no aumento da produção de enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas, assim como em sua maturação e aquisição de funcionalidade.

A maturação do enterócito e da sua capacidade de digestão e absorção são extremamente dependentes da velocidade adequada de sua migração das criptas de Lieberkühn e ao longo do vilo, nesse processo ele adquire funcionalidade. Por esse motivo, elevados pesos relativos de intestino não estão, necessariamente, associados a maior capacidade de absorção e desempenho animal, uma vez que essa massa adicional pode ser resultante de células com baixa maturidade e funcionalidade, explicando a ausência de diferenças no desempenho das aves aos 21 dias, mesmo com diferenças no peso relativo do intestino.

Tabela 3. Peso relativo¹(%) de órgãos de frangos de corte aos 21e 42 dias de idade recebendo dietas contendo diferentes combinações de prebióticos.

	Tratamento					P value	CV ⁶ (%)
	CP ²	DB+BUT ³	GM ⁴ 1/3 +FG ⁵ 2/3	GM1/2 +FG1/2	GM2/3 +FG1/3		
21 dias							
Intestino Delgado	6,55A	5,81B	5,83B	5,74B	5,93AB	0,015	9,28
Fígado	3,04	2,90	3,21	3,12	3,10	0,563	11,92
Pâncreas	0,35	0,35	0,35	0,34	0,36	0,966	11,94
Bursa	0,23	0,20	0,17	0,18	0,17	0,078	26,29
Proventrículo	0,54AB	0,59A	0,50B	0,50B	0,51AB	0,021	12,73
Moela	2,17	2,21	2,25	2,28	2,19	0,928	12,10
Baço	0,10	0,10	0,11	0,09	0,10	0,516	17,61
42 dias							
Intestino Delgado	5,20	5,16	4,91	4,70	4,66	0,539	16,06
Fígado	2,33	2,12	2,02	2,11	2,10	0,127	11,67
Pâncreas	0,22	0,19	0,20	0,20	0,20	0,438	13,88
Bursa	0,10	0,11	0,12	0,10	0,11	0,460	27,76
Proventrículo	0,31	0,29	0,31	0,33	0,32	0,677	18,79
Moela	1,44	1,43	1,37	1,43	1,35	0,925	15,84
Baço	0,11	0,11	0,12	0,10	0,12	0,678	26,08

¹Peso relativo de órgãos (%) = (peso do órgão, g/peso vivo, g) x100; ²CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ³DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com adição de Butirato de Cálcio; ⁴mananos e β-glucanos; ⁵frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁶CV, coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

De maneira semelhante, embora aumentos no proventrículo, local de secreção de ácido clorídrico e pepsinogênio, possam estar associado a maior proteólise gástrica na moela, alterações no peso do complexo moela-proventrículo são tradicionalmente associados à granulometria da ração e menos relacionadas à sua composição (FLEMMING et al., 2002). Embora diferenças tenham sido encontradas aos 21 dias de idade estas são pouco discrepantes a ponto de influenciar o desempenho das aves.

Awad et al. (2009), reportaram diminuição de peso relativo de determinados órgãos (intestino, fígado baço e timo) em aves suplementadas com diversos eubióticos (prebióticos, probióticos e simbióticos), entretanto as diferenças foram associadas às alterações no rendimento de carcaça e ganho de peso, resultados não avaliados ou não encontrados no presente estudo.

As tabelas 4 e 5 apresentam os dados de altura das vilosidades, profundidade de cripta, relação vilosidade/cripta (VC) e densidade de células caliciformes (GC) e linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo, aos 42 e 21 dias de idade das aves.

No segmento duodeno aos 21 dias de idade (Tabela 4), o tratamento GM2/3 +FG1/3 destaca-se com as maiores alturas de vilos, assemelhando-se ao CP e diferindo dos demais. A menor profundidade de cripta coube ao tratamento com Butirato, que se assemelha ao controle positivo e GM2/3 +FG1/3. As melhores relações vilo:cripta correspondem ao CP; DB + BUT e GM2/3 +FG1/3, os dois primeiros, entretanto, não diferindo de GM1/3 +FG2/3.

A densidade de linfócitos intraepiteliais no duodeno não diferiu entre dietas; quanto a densidade de células caliciformes, GM2/3 +FG1/3 difere do CP e DB+BUT, assemelhando-se às demais dietas prebióticas.

Já no jejuno, GM1/2 +FG1/2 apresenta as maiores vilosidades, enquanto CP e DB + BUT as menores; quanto as criptas CP e DB + BUT apresentaram as menores, o controle não diferindo, entretanto, de GM2/3 +FG1/3; a melhor relação vilo:cripta foi encontrada em GM1/2 +FG1/2, que diferiu de todos os tratamentos. As densidades de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais não diferiram entre tratamentos neste segmento.

No íleo, as maiores vilosidades encontram-se em CP e GM1/2 +FG1/2, nas criptas, apenas GM2/3 +FG1/3 diferiu das outras duas dietas prebióticas, e nenhuma diferiu de CP e DB + BUT, em termos absolutos, as criptas diferiram muito pouco entre os tratamentos neste segmento, conseqüentemente há poucas diferenças na relação V:C, somente CP diferiu de GM1/3 +FG2/3.

Quanto a densidade de GC o controle positivo diferiu, com maiores valores, de DB+BUT, GM1/2 +FG1/2 e GM2/3 +FG1/3, conotando menores cargas bacterianas ileais nos tratamentos citados. Menores cargas bacterianas significam menor necessidade de criar barreiras de muco, conseqüentemente reduzindo o número de células caliciformes.

A densidade de IEL não diferiu neste segmento.

Tabela 4. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.

Item	Tratamento					P value	CV ⁵ (%)
	CP ¹	DB+BUT ²	GM ³ 1/3 +FG ⁴ 2/3	GM1/2 +FG1/2	GM2/3 +FG1/3		
Duodeno							
AV, μm	1410,70AB	1358,20BC	1399,00B	1299,50C	1503,20A	<0,001	14,63
PC, μm	156,86BC	154,43C	170,33AB	174,76A	165,32ABC	0,001	21,75
V:C	9,18AB	9,10AB	8,41BC	7,80C	9,39A	<0,001	23,26
GC, n/mm ²	2395,64A	2423,57A	2200,73AB	1922,77AB	1478,52B	0,009	29,71
IEL, n/mm ²	598,28	647,41	685,41	713,10	538,44	0,665	22,92
Jejuno							
AV, μm	695,90D	717,10D	996,90B	1105,00A	878,40C	<0,001	31,39
PC, μm	121,72CD	117,86D	160,04A	141,94B	130,83BC	<0,001	24,69
V:C	5,70C	6,11BC	6,47B	7,88A	6,71B	<0,001	25,53
GC, n/mm ²	2779,36	2313,51	2406,91	2161,5	1982,14	0,092	22,70
IEL, n/mm ²	681,80	397,54	714,25	722,04	655,56	0,385	35,02
Íleo							
AV, μm	583,40A	523,40BC	528,10BC	572,10AB	510,50C	<0,001	22,98
PC, μm	112,81AB	113,81AB	115,80A	116,13A	103,43B	0,007	21,68
V:C	5,32A	4,82AB	4,62B	5,00AB	5,07AB	0,006	25,26
GC, n/mm ²	3374,49A	2135,17B	2337,44AB	1942,31B	1985,35B	0,012	32,37
IEL, n/mm ²	514,00	515,17	550,31	902,58	652,57	0,117	34,56

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com adição de Butirato de Cálcio; ³mananos e β -glucanos; ⁴frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁵CV, coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

Aos 42 dias de idade, no duodeno, em relação ao controle positivo, apenas GM1/2 +FG1/2 não alterou positivamente à altura de vilosidades em relação, entretanto todas as dietas prebióticas apresentaram redução nos vilos em relação ao Butirato.

O ácido butírico, quando naturalmente formado, é proveniente da degradação de fibras alimentares, sendo seus principais substratos o amido resistente e os oligossacarídeos, esse ácido, em particular, parece ter rotas facilitadas no transporte ao interior das células do epitélio intestinal, sendo uma fonte energia preferida para o crescimento benéfico das células epiteliais. Ainda, já são atribuídos ao butirato múltiplos benefícios para a integridade e a saúde intestinal, estimulando o fluxo sanguíneo intestinal, a secreção de mucina, e absorção de eletrólitos e água (KRIPKE et al., 1989; MORTENSEN et al., 1990; CLAUSEN; MORTENSEN, 1995; JÓZEFIAK; RUTKOWSKI; MARTIN, 2004; CANANI et al., 2011; ZHOU et al., 2017). É natural que uma fonte prontamente disponível de um AGCC, não dependente de cepas bacterianas fermentativas, traga resultados mais consistentes na mucosa intestinal, neste caso vilos elevados, criptas rasas, boa relação vilos:cripta, camada de mucina ampla e,

provavelmente devido ao aumento no fluxo sanguíneo epitelial, densidade elevada de IEL.

Tabela 5. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.

Item	Tratamento					P value	CV ⁵ (%)
	CP ¹	DB+BUT ²	GM ³ 1/3 +FG ⁴ 2/3	GM1/2 +FG1/2	GM2/3 +FG1/3		
Duodeno							
AV, μm	1182,41D	1498,11A	1328,14C	1181,78D	1407,98B	<0,001	10,13
PC, μm	155,13C	134,25E	174,68B	145,33D	191,43A	<0,001	13,56
V:C	7,63BC	11,16A	7,61BC	8,15B	7,38C	<0,001	17,72
GC, n/mm ²	2715,50A	2032,17BC	2198,33AB	1941,67BC	1388,00C	<0,001	27,90
IEL, n/mm ²	681,81AB	700,25A	621,53BC	568,07C	590,00C	<0,001	9,09
Jejuno							
AV, μm	505,83D	804,6B	843,43A	831,75AB	645,05C	<0,001	18,64
PC, μm	99,67C	139,72A	123,95B	137,5A	117,78B	<0,001	12,50
V:C	5,08D	5,77BC	6,81A	6,05B	5,49C	<0,001	10,89
GC, n/mm ²	2811,00A	2340,33BC	2652,67AB	2221,17BC	2200,67C	0,001	14,16
IEL, n/mm ²	509,49	665,73	752,93	668,51	513,20	0,047	20,75
Íleo							
AV, μm	530,06B	550,34B	495,5B	671,48A	579,78B	<0,001	14,58
PC, μm	112,9C	125,68AB	132,99A	116,39C	118,43BC	<0,001	7,21
V:C	4,71B	4,38B	3,72C	5,75A	4,89B	<0,001	16,74
GC, n/mm ²	3240,17A	2049,67B	2351,5AB	2008,83B	1895,33B	0,005	32,54
IEL, n/mm ²	485,74B	642,58AB	787,73A	718,84A	717,28A	0,002	17,93

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com adição de Butirato de Cálcio; ³mananos e β -glucanos; ⁴frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁵CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

No jejuno, os efeitos do butirato não permanecem, uma vez que 95% do ácido já é absorvido nas porções proximais do intestino (LAMEIRO et al., 2011). As vilosidades de maior tamanho apresentam-se em GM1/3 +FG2/3 e GM1/2 +FG1/2, as menores no controle positivo. Quanto as criptas, CP apresenta as menores e DB+BUT e GM1/2 +FG1/2 as maiores, a relação vilosidade/cripta é mais pronunciada em GM1/3 +FG2/3, reflexo do maior tamanho dos vilos.

A densidade de GC no jejuno é maior no controle positivo, assim como no duodeno. O resultado repete-se também para GM2/3 +FG1/3, com a menor densidade.

No íleo apenas GM1/2 +FG1/2 difere dos controles e dos demais tratamento prebióticos quanto à altura de vilosidades. Nas criptas, GM1/2 +FG1/2

A relação V:C no íleo foi mais baixa no tratamento GM1/3 +FG2/3 e mais alta em GM1/2 +FG1/2. Ambos os tratamentos citados diferem dos controles. A densidade de GC segue o observado nos demais segmentos: CP com densidades elevadas, de maneira geral, em relação aos prebióticos.

O intestino delgado é o local primário de ocorrência da digestão enzimática e absorção dos nutrientes (EWING; COLE, 1994; KLASING, 1999). Enzimas pancreáticas secretadas através de dutos hidrolisam lipídios, proteínas, amidos e ácidos nucléicos das dietas em oligômeros menores no interior do lúmen do intestino delgado (KLASING, 1999). O duodeno é, portanto, o local de maior importância na degradação do alimento. Quando o quilo adentra o jejuno, as enzimas digestivas continuam atuando sobre ele, é, então, nesse local, que a absorção de nutrientes ocorre em maior intensidade (DAMRON, 2013).

Uma vez que a digesta adentra o íleo, a maior parte da absorção de nutrientes já ocorreu, embora alguns nutrientes sejam particularmente absorvidos nesta região, como o caso da metionina. A função do íleo como zona de transição do intestino delgado para o intestino grosso (DAMRON, 2013) é mais acentuada em mamíferos, dado o pequeno comprimento do mesmo em aves.

Ao longo do intestino delgado estão presentes populações de bactérias que atuam diretamente na fermentação da ração, essas populações são maiores próximas ao intestino grosso, devido ao acúmulo da massa bacteriana ao longo do trato gastrointestinal (EWING; COLE, 1994).

Já é estabelecido que existe uma interação entre a microflora intestinal e a morfologia do trato (HENEGHAN, 1964) e que alterações no crescimento e desenvolvimento desse trato e de seus órgãos acessórios utilizam uma grande proporção dos nutrientes que a ave absorve, bem como sua população microbiana. A suplementação de MOS, por exemplo, já foi relatada como agente trófico de mucosa, aumentando a altura das vilosidades e reduzindo a profundidade das criptas em aves (BAURHOO et al., 2007). Isto indica que a resistência à invasão bacteriana patogênica induzida por prebióticos pode estar

associada a alterações morfológicas mensuráveis da mucosa intestinal, uma vez que as próprias vilosidades, além do muco, atuam como barreira física aos invasores.

Embora neste estudo a alteração no tamanho das vilosidades, criptas e suas interações não tenham afetado o desempenho através da absorção aumentada de nutrientes, é considerável na recomendação da utilização de uma das combinações analisadas sua capacidade em promover saúde nas aves através da construção de barreiras físicas mais consistentes no intestino, embora para isso, estudos mais aprofundados em imunologia sejam pertinentes.

O muco, por sua vez, é a primeira barreira com a qual os nutrientes interagem: a correta difusão através do muco é fundamental para a absorção acesso ao sistema circulatório e seus órgãos-alvo (BANSIL; TURNER, 2006). Fatores ambientais capazes de induzir mudanças na dinâmica das mucinas têm o potencial de afetar a viscosidade e a integridade da camada de muco e o transporte de nutrientes (HORN et al., 2009). A interrupção da homeostase intestinal leva a alterações na barreira de muco que protege o epitélio entérico., um aumento na permeabilidade dessa camada pode resultar em processos inflamatórios e lesões nas células da mucosa (DHARMANI et al., 2009).

Não somente fatores nutricionais alteram a dinâmica do muco e das células caliciformes, de maneira que não é possível inferir que apenas as dietas provocaram as alterações observadas. Vale ressaltar que parece haver uma relação inversa entre a densidade de GC e IEL, em tratamentos com maiores camadas de mucina existe menor necessidade de deslocamento de IEL para a segunda linha defesa.

A tabela 6 mostra os dados referentes à quantificação de ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal. Não foi possível identificar diferenças nos AGCC quantificados entre os tratamentos.

Tabela 6. Ácidos graxos de cadeia curta em conteúdo cecal de frangos de corte recebendo dietas contendo diferentes combinações de prebióticos.

		Tratamento					<i>P value</i>	CV ⁵ (%)
		CP ¹	DB+BUT ²	GM ³ 1/3 +FG ⁴ 2/3	GM1/2 +FG1/2	GM2/3 +FG1/3		
mM/Kg	Acetato	493,20	524,26	488,95	476,61	583,66	0,568	23,32
	Propionato	97,85	91,64	72,58	77,85	103,56	0,387	35,11
	Butirato	104,64	115,92	106,33	114,60	123,09	0,653	20,22
%Molar	Acetato	71,02	71,51	73,07	71,17	71,96	0,516	3,04
	Propionato	13,60	12,63	10,88	11,47	12,82	0,307	19,73
	Butirato	15,38	15,85	16,05	17,36	15,22	0,322	11,91

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com adição de Butirato de Cálcio; ³mananos e β -glucanos; ⁴frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁵CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

A ausência de alterações na produção de ácidos graxos de cadeia curta pode indicar que os diferentes níveis, e conseqüentemente o fornecimento de quantidades diferentes de substrato fermentativo, pode não ter impacto direto sobre a quantidade de ácidos graxos produzidos e por associação a maiores populações de bactérias fermentativas, uma vez que os dois mecanismos são interdependentes.

Ainda, diversos fatores não relacionados à dieta podem ter influência nas populações bacterianas do intestino tais como idade, fases do desenvolvimento, doenças, estado nutricional e dieta. Alterações da flora bacteriana são observadas desde nascimento, quando a mesma se estabelece e coloniza o sistema gastrointestinal, bem como com o contato direto com o meio ambiente e com os microrganismos presentes nos alimentos (TRINDADE, 2004).

Ao e Choct (2013) relatam em estudo com MOS e FOS comparados a Bacitracina de Zinco, aumento na concentração de ácido propiônico no conteúdo cecal, entretanto os aditivos falharam em gerar diferenças significativas sobre o acetato, o butirato, as concentrações totais de AGCC ou pH do conteúdo cecal. Os ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o ácido butírico, são conhecidos por reduzirem o pH do conteúdo intestinal e possuem propriedades antibacterianas (BOHNHOFF; MILLER; MARTIN, 1964; MEYNELL, 1963). De fato, está bem demonstrado que a suplementação de oligossacarídeos aumenta a fermentação no ceco, cujos produtos finais são predominantemente acetato, propionato e butirato (CAMPBELL; FAHEY; WOLF, 1997; JÓZEFIAK; RUTKOWSKI; MARTIN, 2004).

As dietas utilizadas neste estudo, predominantemente constituídas de farelo de soja e milho, é composta por baixos teores de polissacarídeos não-amiláceos (NSP). Isso poderia explicar a ausência de diferenças na concentração de AGCC em dieta prebióticas, já que a atividade microbiana pode ser inibida pela melhora na digestibilidade e redução do teor de NSP na dieta (BEDFORD, 2000).

As tabelas 7 e 8 apresentam os dados relativos à hematologia: diferencial de leucócitos, relação heterófilo:linfócito juntamente com a área cortical de Bursa. A porcentagem de córtex da Bursa de Fabricius foi apresentada nas mesmas tabelas devido à importância desse órgão na hematopoese e consequente formação de componentes sanguíneos.

Tabela 7. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.

Tratamento	LINF ¹	HET ²	MONO ³	EOSIN ⁴	BASOF ⁵	TROMB ⁶	H/L ⁷	Córtex (%)
CP ⁸	63,30	6,17	2,50	7,00	1,33	23,60	0,15	49,78
DB+BUT ⁹	75,83	7,67	2,67	5,83	0,80	8,80	0,14	51,41
GM ¹⁰ 1/3+FG ¹¹ 2/3	72,50	3,50	3,33	4,00	0,50	16,17	0,05	50,53
GM1/2+FG1/2	82,00	5,33	1,17	0,33	0,83	10,33	0,08	49,84
GM2/3+FG1/3	53,33	12,33	1,33	3,83	0,33	28,83	0,31	49,65
<i>P value</i>	0,176	0,119	0,309	0,054	0,885	0,289	0,086	0,450
CV ¹² (%)	32,05	82,88	127,68	109,63	143,78	106,33	127,64	13,65

¹LINF: linfócito; ²HET: heterófilo; ³MONO: monócito; ⁴EOSIN: eosinófilo; ⁵BASOF: basófilo; ⁶TROMB: trombócitos; ⁷H/L: relação heterófilo:linfócito; ⁸CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ⁹DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com adição de Butirato de Cálcio; ¹⁰mananos e β -glucanos; ¹¹frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ¹²CV, coeficiente de variação.

Médias de parâmetros sanguíneos seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (5%).

Não foi possível identificar diferenças em nenhum dos parâmetros estudados nas duas idades de coleta. Entretanto, é interessante destacar a diminuição na contagem de leucócitos e aumento no número de heterófilos de uma idade para a seguinte, e consequentemente a modificação extrema da relação heterófilo:linfócito entre as idades.

Sabe-se que a relação heterófilo/linfócito é indicador primário de estresse em aves, o aumento na porcentagem de heterófilos é indicativo de estresse ambiental (GROSS; SIEGEL, 1983; MCFARLANE et al., 1989).

Tabela 8. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.

Tratamento	LINF ¹	HET ²	MONO ³	EOSIN ⁴	BASOF ⁵	TROMB ⁶	H/L ⁷	Córtex (%)
CP ⁸	23,83	14,83	1,33	4,33	4,67	51,00	4,65	48,29
DB+BUT ⁹	35,17	21,17	5,50	11,83	5,83	20,50	1,32	48,59
GM ¹⁰ 1/3+FG ¹¹ 2/3	45,80	6,83	3,67	11,00	1,83	30,80	3,42	50,55
GM1/2+FG1/2	41,00	19,33	1,67	3,17	2,83	32,00	0,58	49,53
GM2/3+FG1/3	50,00	8,50	4,50	8,50	3,67	24,83	0,42	50,40
<i>P value</i>	0,449	0,078	0,063	0,876	0,426	0,315	0,101	0,970
CV ¹² (%)	65,14	75,03	82,38	155,75	97,03	83,73	256,97	13,06

¹LINF: linfócito; ²HET: heterófilo; ³MONO: monócito; ⁴EOSIN: eosinófilo; ⁵BASOF: basófilo; ⁶TROMB: trombócitos; ⁷H/L: relação heterófilo:linfócito; ⁸CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ⁹DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com adição de Butirato de Cálcio; ¹⁰mananos e β -glucanos; ¹¹frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ¹²CV, coeficiente de variação.

Médias de parâmetros sanguíneos seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (5%).

Diversos outros fatores, fisiológicos e ambientais, colaboram para a variabilidade nos parâmetros sanguíneos de frangos de corte saudáveis como a dieta, fornecimento de água, jejum, administração de drogas, entre outros (NEVELING et al., 2017).

Tabela 9. Contagem de unidades formadoras de colônia de *E. coli* cecal e halos de inibição de bactérias ácido lácticas^(*) contra *Salmonella enterica* serovar Heidelberg de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.

	CP ³	DB+BUT ⁴	GM ⁵ 1/3 +FG ⁶ 2/3	GM1/2 +FG1/2	GM2/3 +FG1/3	<i>P value</i>	CV ⁷ (%)
<i>E. coli</i> ¹	6,701	6,301	6,292	6,016	6,133	0,233	12,73
Halos ²	0,95B	0,62C	1,36A	1,09B	1,05B	<0,001	33,67

*Pool de bactérias ácido lácticas. ¹Valores expressos em Log₁₀ UFC. ²Valores expressos em milímetros. ³CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ⁴DB+BUT, sem antibiótico e sem prebióticos, com Butirato de Cálcio; ⁵mananos e β -glucanos; ⁶frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁷CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

A Tabela 9 mostra os resultados de microbiologia cecal: contagem de unidades formadoras de colônia de *E. coli* e atividade inibitória de substâncias antagônicas produzidas pelas amostras do pool de bactérias ácido-láticas (LAB) cecais frente à *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, sendo possível constatar que houve alteração significativa ($p \leq 0,05$) apenas na taxa inibitória, os maiores valores foram encontrados em GM1/3 +FG2/3, diferindo inclusive do controle positivo, o menor halo de inibição coube ao tratamento com butirato.

O conhecimento sobre os mecanismos inibitórios relacionados à LAB e seus metabólitos já são conhecidos e intensamente estudados. A inibição do crescimento do patógeno é mediada pelo ambiente ácido resultante da produção de ácidos pelas LAB, bem como pelos compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas, a reuterina e o peróxido de hidrogênio, produzidos nativamente por algumas cepas de LAB; ainda devido ao crescimento competitivo contra bactérias patogênicas ou putrefativas (HAMMES; TICHACZEK, 1994).

Os ácidos orgânicos produzidos pelas LAB, incluindo o ácido lático, acético e propiônico, exercem efeitos antimicrobianos devido à sua ação na membrana citoplasmática bacteriana, interferindo na manutenção do potencial de membrana e inibindo o transporte ativo de moléculas (DE VUYST; VANDAMME, 1994; DE VUYST, 2007).

Barrangou et al. (2006) relatam que *Lactobacillus acidophilus* NCFM, comumente encontrado em alimentos probióticos, possuem transportadores específicos para a captação de rafinose e FOS, o que pode ter gerado fermentação, e maior disponibilidade de nutrientes para as bactérias, no tratamento com maior inclusão de FOS, já transportadores e enzimas para MOS e β -glucanos são de expressão mais variável entre espécies fermentativas do trato gastrointestinal.

A *Salmonella enterica* serovar Heidelberg (*S. Heidelberg*), multirresistente à drogas, tem sido associada a numerosos surtos de doenças transmitidas por alimentos em humanos, especialmente relacionada ao consumo de produtos avícolas (BEARSON et al., 2017; NAKAO et al., 2018). Os halos de inibição, embora de tamanho reduzido, demonstram potencial de controle de proliferação desse patógeno sem aplicação de antibióticos.

O controle de patógenos por inibição competitiva por LAB ainda apresenta a vantagem de não alterar significativamente as propriedades sensoriais características dos produtos finais (KOSTRZYNSKA; BACHAND, 2006).

5. CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que prebióticos nos níveis estudados podem substituir os AMD em dietas para frangos de corte sem prejuízo ao desempenho e sem alterações fisiológicas internas ao organismo, considerando o fator custo, o nível de 0,1% é o mais recomendado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOBE PHOTOSHOP CREATIVE CLOUD. Versão 19.1.4. San Jose, CA: Adobe Systems Incorporated, 2018.
- AMMERMAN, E.; QUARLES, C.; TWINING JUNIOR, P.V. Evaluation of fructooligosaccharides on performance and carcass yield of male broilers. **Poultry Science**, v.68, p.167, 1989.
- ANDERSON, D. B.; MCCRACKEN, V. J.; AMINOV, R. I.; SIMPSON, J. M.; MACKIE, R. I.; VERSTEGEN, M. W. A.; GASKINS, H. R. Gut Microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. **Pig News and Information**, v. 20, p. 115–122, 1999.
- AO, Z.; CHOCT, M. Oligosaccharides affect performance and gut development of broiler chickens. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 26, n. 1, p. 116–21, jan. 2013.
- AWAD, W. A.; GHAREEB, K.; ABDEL-RAHEEM, S.; BOHM, J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 1, p. 49–56, 1 jan. 2009.
- BANSIL, R.; TURNER, B. S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2–3, p. 164–170, 1 jun. 2006.
- BARRANGOU, R.; AZCARATE-PERIL, M. A.; DUONG, T.; CONNERS, S. B.; KELLY, R. M.; KLAENHAMMER, T. R. Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3816–21, 7 mar. 2006.
- BAURHOO, B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C. A. Cecal Populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* Populations after in Vivo *Escherichia coli* Challenge in Birds Fed Diets with Purified Lignin or Mannanooligosaccharides. **Poultry science**, v. 86, n. 12, p. 2509–16, 1 dez. 2007.
- BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. D.; LOOFT, T.; CAI, G.; SHIPPY, D. C. Characterization of a Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Outbreak Strain in Commercial Turkeys: Colonization, Transmission, and Host Transcriptional Response. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 156, 25 set. 2017.

- BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition — their current value and future benefits. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 1–2, p. 1–13, 31 jul. 2000.
- BOHNHOFF, M.; MILLER, C. P.; MARTIN, W. R. RESISTANCE OF THE MOUSE'S INTESTINAL TRACT TO EXPERIMENTAL *SALMONELLA* INFECTION. I. FACTORS WHICH INTERFERE WITH THE INITIATION OF INFECTION BY ORAL INOCULATION. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 120, p. 805–16, 1964.
- CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 1, p. 130–136, 1 jan. 1997.
- CANANI, R. B.; COSTANZO, M. Di; LEONE, L.; PEDATA, M.; MELI, R.; CALIGNANO, A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World journal of gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1519–28, 28 mar. 2011.
- CHARLES NORIEGA, M. I. V. C. Apuntes de hematología aviar: Material didático para curso de hematología aviária. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. 2000. 70 p. Apostila.
- CLAUSEN, M. R.; MORTENSEN, P. B. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. **Gut**, v. 37, n. 5, p. 684–9, nov. 1995.
- DAMRON, W. S. **Introduction to animal science : global, biological, social, and industry perspectives**. [s.l.] Pearson, 2013.
- DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 194–199, 2007.
- DE VUYST, L.; VANDAMME, E. 801000181933. **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications**. [s.l.] London, 1994.
- DHARMANI, P.; SRIVASTAVA, V.; KISSOON-SINGH, V.; CHADEE, K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. **Journal of innate immunity**, v. 1, n. 2, p. 123–35, 2009.
- DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism1. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 453–463, 1 dez. 2002.
- ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.
- European Union. Regulation (EC) N° 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 september 2003 on additives for use in animal nutrition. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32003R1831>. Acesso em: 23 jul. 2018.

- EWING, W. N.; WESLEY, N.; COLE, D. J. A. **The living gut : an introduction to micro-organisms in nutrition**: Context, 1994.
- FLEMMING, J. S. Utilização de leveduras, probióticos e mananoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frangos de corte. 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.
- FLEMMING, J. S.; NETO, M.; ARRUDA, J. S.; FRANCO, ; FLEMMING, ; SOUZA, ; FLEMMING, G. A. RAÇÃO FARELADA COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS EM FRANGOS DE CORTE (Use of mashed rations with different particle sizes for broilers). **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2002.
- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte Dynamics and Mucosal Development in the Posthatch Chick. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 776–782, 1 jun. 2001.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 972, out. 1983.
- HAMMES, W. P.; TICHACZEK, P. S. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 198, n. 3, p. 193–201, mar. 1994.
- HARRIS LJ, DAESCHEYL MA, STILES ME, KLAENHAMMER TR. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. 1999;52:384–887.
- HENEGHAN, J. B. Imbalance of the Normal Microbial Flora. p. 864–869, 1964.
- HORN, N. L.; DONKIN, S. S.; APPLGATE, T. J.; ADEOLA, O. Intestinal mucin dynamics: Response of broiler chicks and White Pekin ducklings to dietary threonine. **Poultry Science**, v. 88, n. 9, p. 1906–1914, 1 set. 2009.
- JÓZEFIAK, D.; RUTKOWSKI, A.; MARTIN, S. . Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 113, n. 1–4, p. 1–15, 5 mar. 2004.
- JÓZEFIAK, D.; RUTKOWSKI, A.; MARTIN, S. . Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 113, n. 1–4, p. 1–15, 5 mar. 2004.
- KLASING, K. C. Avian gastrointestinal anatomy and physiology. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 8, n. 2, p. 42–50, 1 abr. 1999.
- KOSTRZYNSKA, M.; BACHAND, A. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 1017–1026, nov. 2006.
- KRIPKE, S. A.; FOX, A. D.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L. Stimulation of Intestinal Mucosal Growth with Intracolonic Infusion of Short-Chain Fatty Acids. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 109–116, 2 mar. 1989.
- LAMEIRO, T. M. do M.; SILVA, C. M. G. da; MARQUES, L. H. S.; CUNHA, F. L. da; ALMEIDA, M. G. de; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. R. Efeitos do butirato nos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica sem trânsito fecal: estudo

- experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 31, p. 155–164, 2011.
- MCFARLANE, J. M.; CURTIS, S. E.; SIMON, J.; IZQUIERDO, O. A. Multiple Concurrent Stressors in Chicks.: 2. Effects on Hematologic, Body Composition, and Pathologic Traits. **Poultry Science**, v. 68, n. 4, p. 510–521, 1 abr. 1989.
- MINITAB 18 STATISTICAL SOFTWARE. State College, PA: Minitab, Inc., 2017.
- MORTENSEN, F. V; NIELSEN, H.; MULVANY, M. J.; HESSOV, I. Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries. **Gut**, v. 31, n. 12, p. 1391–4, dez. 1990.
- NAKAO, J. H.; TALKINGTON, D.; BOPP, C. A.; BESSER, J.; SANCHEZ, M. L.; GUARISCO, J.; DAVIDSON, S. L.; WARNER, C.; MCINTYRE, M. G.; GROUP, J. P.; COMSTOCK, N.; XAVIER, K.; PINSENT, T. S.; BROWN, J.; DOUGLAS, J. M.; GOMEZ, G. A.; GARRETT, N. M.; CARLETON, H. A.; TOLAR, B.; WISE, M. E. Unusually high illness severity and short incubation periods in two foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections with potential coincident *Staphylococcus aureus* intoxication. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 01, p. 19–27, 6 jan. 2018.
- NEVELING, D. P.; VAN EMMENES, L.; AHIRE, J. J.; PIETERSE, E.; SMITH, C.; DICKS, L. M. T. Safety assessment of antibiotic and probiotic feed additives for *Gallus gallus domesticus*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12767, 16 dez. 2017.
- PIRES, D. L. [UNESP]. Efeito da inoculação via esofágica de microbiota intestinal sobre a hematologia, desenvolvimento e integridade intestinal de pintos de corte. **Aleph**, p. i, 96 f. : il., 25 jan. 2008.
- RICKE, S. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632–639, 1 abr. 2003.
- ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, n. 1, p. 329-334, 1947.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição dos alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa: UFV, 2011. 252p.
- TRINDADE, B.S.M.E. (2004) Avaliação da flora bacteriana intestinal e do estado nutricional de indivíduos infectados pelo HIV-1, suplementados com fibra solúvel e probiótico. 99p. Tese (Doutorado em Moléstias Infecciosas) – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina de Botucatu.
- WATKINS, B. A.; KRATZER, F. H. Effect of Oral Dosing of *Lactobacillus* Strains on Gut Colonization and Liver Biotin in Broiler Chicks. **Poultry Science**, v. 62, n. 10, p. 2088–2094, 1 out. 1983.
- ZHOU, D.; PAN, Q.; XIN, F.-Z.; ZHANG, R.-N.; HE, C.-X.; CHEN, G.-Y.; LIU, C.; CHEN, Y.-W.; FAN, J.-G. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 60–75, 7 jan. 2017.

CAPÍTULO III

DESEMPENHO, SAÚDE, AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PREBIÓTICOS

Resumo. Neste estudo, 1250 pintos de corte machos, linhagem ROSS AP95, foram casualmente distribuídos em 5 tratamentos, com 10 unidades experimentais cada, objetivando testar diferentes níveis de combinação de mananos com β -glucanos e frutoligosacarídeos com galactoligosacarídeos em dietas de frangos de corte. Os tratamentos consistiram de: CP, dieta basal (DB)+AMD; 0,1%; 0,2%; 0,3% e 0,4% de inclusão da mistura prebiótica. Foram avaliados o desempenho, peso relativo de órgãos, integridade de vilosidades, densidade de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais, histomorfometria de Bursa de Fabricius e contagem diferencial de leucócitos no sangue, ainda, foi determinada a produção de ácidos graxos de cadeia curta nos cecos e realizada contagem de unidades formadoras de colônias de *E. coli* e teste da atividade inibitória *in vitro* das substâncias antagônicas produzidas pelas amostras do *pool* de bactérias ácido lácticas cecais frente à *Salmonella enterica* serovar Heidelberg. Os dados foram submetidos a ANOVA seguida de teste de médias de Tukey (5%), as contagens sanguíneas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis (5%). Os resultados não demonstram efeito da inclusão de maiores níveis de prebióticos sobre o desempenho e eficiência produtiva de frangos aos 42 dias de idade, considerando essa semelhança e o fator custo na inclusão de aditivos em dietas para aves, é possível recomendar a substituição do AMD por 0,1% de mistura de prebióticos sem prejuízos à produção.

Palavras-chave: AGCC, Antibiótico, FOS, GOS, MOS, *Salmonella*.

**PERFORMANCE, HEALTH, HISTOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL
ASSESSMENT OF BROILER CHICKENS FED DIFFERENT PREBIOTICS
LEVELS**

Abstract. In this study, 1250 male ROSS AP95 day-old chicks, were randomly allotted in 5 treatments, with 10 experimental units each, aiming to test different combinations of mannan with β -glucans and fructooligosaccharides with galactooligosaccharides in broiler diets. Treatments consisted of: positive control (PC), basal diet (BD)+performance enhancer antibiotic (PEA); 0.1%; 0.2%; 0.3% and 0.4% inclusion of the prebiotic mixture. The performance, relative organ weight, villi integrity, goblet cell and intraepithelial lymphocytes density, Fabricius Bursa histomorphometry and differential leukocyte count in the blood; the production of cecal short chain fatty acids, counting of *E. coli* colony forming units and an *in vitro* inhibitory activity of the antagonistic substances produced by the samples of the cecal lactic acid bacteria against *Salmonella enterica* serovar Heidelberg test were also evaluated. Data were submitted to ANOVA followed by a Tukey test (5%), blood counts were submitted to Kruskal-Wallis test (5%). The results do not demonstrate effects of higher inclusion levels of prebiotics on the chickens performance and productive efficiency of at 42 days of age, considering this similarity and the cost factor of additives inclusion in poultry diets, it is possible to recommend the replacement of PEA by 0.1% prebiotic mixture without production impairment.

Keywords: Antibiotic, FOS, GOS, MOS, *Salmonella*, SCFA.

1. INTRODUÇÃO

A indústria avícola durante as últimas duas décadas tem sido um dos setores mais dinâmicos e em constante expansão do mundo. Com o aumento constante da população humana, a indústria avícola é uma das principais responsáveis por preencher o espaço entre a exigência e a disponibilidade de proteína de alta qualidade para consumo humano. A demanda por uma fonte de proteína mais saudável e segura, livre de agentes contaminantes, aumenta à medida que o mercado se expande e diversifica.

No entanto, é inerente aos sistemas de alta produtividade o confronto com diversos desafios, como doenças, por exemplo. Esses desafios além de inferirem custo ao sistema ainda ocasionam perda de produtividade e rendimento de produtos. Esse cenário levou ao aumento gradativo do uso de antibióticos na indústria avícola para fins terapêuticos, profiláticos e de promoção do crescimento. A possível presença dos resíduos desses antibióticos na carne e nos ovos de aves, decorrente de mau uso, passou então a ser preocupação do consumidor final.

Esses resíduos de antibióticos podem causar resistência da flora humana e micróbios patogênicos àqueles grupos de antibióticos.

Surgiu então uma necessidade na busca de produtos alternativos capazes de proporcionar melhor desempenho para os animais, diminuir a contaminação das carcaças por bactérias patogênicas, sem os riscos da presença de resíduos nocivos que possam causar problemas de saúde aos consumidores da carne do frango. Os prebióticos se encaixam nessa necessidade, são oligossacarídeos não digestíveis pelas aves mas fermentáveis pela microbiota intestinal desejável, que tem demonstrado eficiência na modulação benéfica da microbiota intestinal melhorando a condição sanitária geral do intestino, beneficiando desempenho, digestibilidade e imunidade (SILVA e NÖRNBERG, 2003).

Considerando a importância da pesquisa de novos aditivos que possam potencializar efeitos benéficos no trato gastrointestinal e, portanto, aumentar os índices de desempenho, como os oligossacarídeos, são justificáveis estudos que ajudem a compreender os benefícios destes na saúde dos animais, bem como quais níveis de inclusão destes substratos fermentativos que podem trazer efeitos adicionais à produtividade.

2. OBJETIVO

Este estudo objetivou determinar o nível ideal de inclusão de prebióticos combinados (GLUCANMOS 67% da mistura, FOS:GOS 33% da mistura, proporção 1:1) em dietas de frangos de corte. Os critérios de avaliação para recomendação foram: desempenho, peso relativo de órgãos, integridade e imunidade intestinal, imunidade das aves via histomorfometria da Bursa e contagem diferencial de leucócitos, bem como os efeitos na microbiota cecal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

Foram alojados 1250 pintos de corte, machos, da linhagem ROSS AP95, vacinados no incubatório contra doença de Marek e Gumboro. As aves foram distribuídas em 70 boxes de 2,0 m² com 25 aves por boxe, munidos de comedouros tipo tubular e bebedouros tipo nipple, em aviário de pressão negativa, do Laboratório de Nutrição de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu.

A cama, de 10 cm de espessura, foi reutilizada por quatro lotes consecutivos afim de simular os desafios das condições de campo.

Água e ração foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental, o programa de luz seguiu as orientações do manual da linhagem de frangos selecionada.

As aves foram distribuídas em blocos casualizado com cinco tratamentos e dez repetições cada. Os tratamentos foram:

- CP: dieta basal + antibiótico melhorador de desempenho (AMD);
- 0,1%: dieta basal + 1,0 kg/ton. de GLUCAN MOS FOS:GOS
- 0,2%: dieta basal + 2,0 kg/ton. de GLUCAN MOS FOS:GOS
- 0,3%: dieta basal + 3,0 kg/ton. de GLUCAN MOS FOS:GOS
- 0,4%: dieta basal + 4,0 kg/ton. de GLUCAN MOS FOS:GOS

Todas as dietas experimentais utilizadas foram isoenergéticas, isoproteicas e isoaminoacídicas, de acordo com as recomendações nutricionais propostas por Rostagno et al. (2011) para frangos de corte de desempenho médio, e divididas em quatro fases: pré-inicial (1 – 7 dias), inicial (8 – 21 dias), crescimento (22 – 35 dias) e final (36 – 42 dias).

Os prebióticos utilizados foram obtidos de indústria especializada e sua inclusão se deu em detrimento do material inerte das dietas.

3.2. Variáveis Analisadas

3.2.1. Desempenho

Todas as parcelas experimentais foram pesadas aos 7, 21, 35 e 42 dias para a determinação do peso corporal, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar. Ao final do período experimental foi calculada a viabilidade baseada no controle diário de mortalidade e o fator de eficiência produtiva pela seguinte fórmula:

$$FEP = (\text{Peso Corporal} \times \text{Viabilidade}) / (\text{Conversão Alimentar} \times \text{Idade de Abate}) \times 100$$

3.2.2. Peso Relativo de Órgãos

Aos 21 e 42 dias de idade, foi retirada uma ave no peso médio de cada unidade experimental, pesada e eutanasiada após jejum de duas horas, para posterior coleta e pesagem de fígado, proventrículo, moela, intestino delgado, pâncreas, baço e Bursa de Fabrícus. Os dados foram utilizados para o cálculo dos pesos relativos em relação ao peso corporal da ave em jejum.

Tabela 1. Composição centesimal e nutricionais das dietas experimentais.

	Pré-Inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho, Grão Moído	54,103	58,190	60,731	65,803
Farelo de Soja, 45%	38,497	34,990	31,789	27,518
Óleo de Soja	2,528	2,509	3,523	3,225
DL-Metionina (99%)	0,356	0,285	0,254	0,238
L-Lisina HCl (78,4%)	0,276	0,208	0,184	0,225
L-Treonina (98,5%)	0,103	0,057	0,039	0,047
Fosfato Bicálcico	1,907	1,509	1,274	1,070
Calcário Calcítico	0,913	0,923	0,863	0,769
Sal Comum	0,306	0,199	0,096	0,444
Bicarbonato de Sódio	0,296	0,416	0,532	0,000
Premix Vitamínico ¹	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Mineral ²	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de Colina	0,060	0,060	0,060	0,060
Anticoccidiano ³	0,055	0,055	0,055	0,000
Inerte	0,400	0,400	0,400	0,400
Composição Nutricional Calculada				
EM (kcal/kg)	2950	3000	3100	3150
PB (%)	22,20	20,80	19,50	18,00
Cálcio (%)	0,920	0,819	0,732	0,638
Fósforo disponível (%)	0,470	0,391	0,342	0,298
Metionina dig. (%)	0,645	0,562	0,518	0,485
Metionina+cistina dig. (%)	0,944	0,846	0,787	0,737
Lisina dig. (%)	1,310	1,174	1,078	1,010
Treonina dig. (%)	0,852	0,763	0,701	0,656
Cloro, %	0,234	0,171	0,109	0,318
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195
Potássio (%)	0,861	0,809	0,758	0,694
Ácido Linoleico (%)	2,740	2,776	3,343	3,241

¹Premix vitamínico para frangos de corte (BRNova®), níveis de garantia por kg de produto: Vit. A, 9.000.000 UI; Vit. D3, 2.500.000 UI; Vit. E, 14.000 UI; Ácido Fólico, 1.000 mg; Ácido Pantotênico, 15 mg; Niacina, 40 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B2, 6.200 mg; Vit. B1, 2.500 mg; Vit. B12, 14.000 µg; Vit. K3, 2.000 mg; B.H.T., 100 mg.

²Premix vitamínico para frangos de corte (BRNova®), níveis de garantia por kg de produto: Fe, 50 g; Cu, 10 g; Mn, 80 mg; Zn, 60 g; I, 1.200 mg; Se, 200 mg.

3.2.3. Barreiras Físicas do Intestino Delgado

Foram coletados fragmentos de duodeno, jejuno e íleo para análises histomorfométricas de uma ave por unidade experimental aos 21 e 42 dias de idade. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% por 24 horas e em seguida armazenadas em álcool 70%. Para a confecção das lâminas histológicas, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool (álcool 70%; 80%; 90%; 100%; 100%; 100%) por 30 minutos por passagem. Posteriormente diafanizadas em solução álcool: xilol (1:1) por 30 minutos e xilol 100% por 30 minutos, imersas em Paraplast® (parafina) em estufa a 55°C por 90 minutos e, incluídas em Paraplast® para formação dos blocos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à microtomia obtendo-se corte histológicos de cinco micrômetros de espessura, os quais foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina.

A altura dos vilos e profundidade das criptas dos segmentos intestinais foram determinadas por meio de imagens, obtidas em microscópio óptico com objetiva planapocromática 10X. As imagens foram capturadas com câmera acoplada ao microscópio e transferidas para um analisador de imagem (Leica Application Suite 3.5). Vinte leituras de altura de vilos e profundidade de cripta foram realizadas por lâmina e por segmento intestinal, que corresponde a uma ave por parcela experimental. A altura de vilos foi medida da região apical à região basal, que corresponde à porção superior das criptas. As criptas foram medidas da base até a região de transição entre a cripta e o vilos.

3.2.4. Barreiras Imunológicas do Intestino Delgado

3.2.4.1. Linfócitos Intraepiteliais Intestinais (IEL)

A densidade de linfócitos intraepiteliais intestinais (IEL) foi determinada em cada lâmina nos três segmentos do intestino delgado. Uma imagem foi obtida em câmera acoplada a microscópio óptico com objetiva de 20x e analisada pelo software Leica Application Suite 3.5. Em uma área delimitada e conhecida foi realizada contagem total dos linfócitos intraepiteliais, sendo os resultados expressos em número de células por unidade de área em milímetros quadrados.

3.2.4.2. Células Caliciformes (Gc)

De cada lâmina dos três segmentos intestinais, uma imagem foi obtida em câmera acoplada a microscópio ótico com objetiva de 20x. A imagem foi segmentada pelo procedimento de *threshold* do *software* Adobe Photoshop® CC (2018) e analisada pelo *software* Leica Application Suite 3.5. Em uma área delimitada e conhecida foi realizada contagem total das células caliciformes, sendo os resultados expressos em número de células por unidade de área em milímetros quadrados.

3.2.5. Histomorfometria de Bursa de Fabrícus

Foi coletada a Bursa de Fabrícus de uma ave por unidade experimental, aos 21 e 42 dias, e fixadas em formol a 10% neutro tamponado. A confecção das lâminas histológicas seguiu os mesmos procedimentos adotados para os fragmentos de intestino. Foram analisados 15 folículos completos por lâmina, correspondente a uma ave por parcela experimental. Foram escolhidos para leitura, folículos em que o corte passou pela região central. Cada folículo selecionado foi circundado por uma linha, obtendo-se a área folicular total e, em seguida, delimitada a porção medular do mesmo folículo, passando uma linha sobre a membrana basal que divide a área cortical da medular para cálculo da porcentagem de córtex folicular.

3.2.6. Contagem Diferencial de Leucócitos e Relação Heterofilo/Linfócito

Para a contagem de leucócitos e relação heterofilo: linfócito, foram coletados 2mL de sangue de uma ave por unidade experimental, por meio de punção da veia ulnar com seringa heparinizada. Imediatamente após a coleta, extensões sanguíneas foram preparadas e armazenadas para serem coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A contagem foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100x, conforme metodologia proposta por Charles Noriega (2000).

3.2.7. Microbiologia Cecal

Foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) de *E. coli*, bem como o teste da atividade inibitória in vitro das substâncias antagônicas produzidas pelas amostras de Lactobacilos cecais frente à *Salmonella enterica* serovar Heidelberg.

Para tanto, um dos cecos de uma ave por unidade experimental foi removido assepticamente logo após o abate da ave, sendo posteriormente acondicionado em bolsa plástica estéril e homogeneizado com PBS na proporção de 1:10, obtendo-se diluição 10^{-1} . Foram realizadas diluições seriadas até 10^{-10} em microtubos graduados contendo PBS, com posterior plaqueamento de 0,1 mL em meio Ágar MacConkey, as placas foram incubadas durante 24 horas à temperatura de 37°C. O número de UFC/grama de conteúdo cecal obtido foi convertido em \log_{10} para interpretação dos resultados.

Um *pool* de bactérias ácido lácticas cecais foi obtido através do plaqueamento em meio MRS Ágar e preservado em nitrogênio líquido (caldo MRS + glicerina PA 30%) para avaliação de halo de inibição.

A atividade inibitória das substâncias antagônicas produzidas pelas amostras de bactérias ácido lácticas cecais frente à *S. enterica* foi mensurada utilizando-se o método de antagonismo “*Spot on the lawn*”, de acordo com Harris et al. (1989).

As amostras do *pool* de bactérias ácido lácticas foram reativadas em Caldo MRS, através de incubação a 38°C por 24 horas. Após esse período, três alíquotas de 10 μ L de cada amostra experimental foram posicionadas de forma equidistante sobre placas de Petri estéreis, preparadas previamente com meio de cultura MRS Ágar, e novamente incubadas por 18 horas a 38°C.

Paralelamente, foram preparados tubos graduados tipo *falcon*, com tampa, contendo 5 mL do meio caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) que condicionaram amostras do microrganismo indicador (*S. enterica* serovar Heidelberg), proveniente da Bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da Unesp/Botucatu. Estes tubos foram levados à estufa para que os microrganismos fossem reativados através de incubação a 38°C por 12 horas. Momentos antes da finalização das incubações foram preparados,

ainda, tubos graduados contendo 15 mL do meio BHI com 0,7% de Ágar, para acondicionarem as amostras de *S. enterica* reativadas.

Em cada tubo contendo 15 mL de Ágar BHI foi adicionada uma alíquota de 150 µL da amostra semeada do microrganismo indicador, sendo logo após mantidos em banho maria a 45°C para equilibrar temperaturas. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi cuidadosamente vertido nas placas incubadas com as amostras de bactérias ácido lácticas em pontos equidistantes. Após completa secagem e solidificação da camada de BHI + *Salmonella*, as placas foram incubadas a 38°C por 24 horas.

O antagonismo foi detectado pela presença de zonas/halos de inibição ao redor das culturas de bactérias ácido lácticas e mensurados em milímetros em *software* de processamento de imagens (Leica Application Suite 3.5).

3.2.8. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta nos cecos

Aos 42 dias de idade, foi coletado um grama de conteúdo cecal e posteriormente diluído em 2mL de ácido fórmico (17%). Após centrifugação a $12.000 \times g$ a 4° C por 10 minutos, o sobrenadante (2mL) foi submetido à análise por cromatografia a gás para determinação da concentração dos ácidos acético, butírico e propiônico (ERWIN et al., 1961). As análises foram feitas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FVMZ, USP, Campus de Pirassununga, SP.

3.3. Avaliação Estatística

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$), através do procedimento de Modelo Linear Generalizado (GLM) do *software* estatístico Minitab® (Minitab Versão 18, Minitab Inc., State College, PA, 2017). Os índices de colonização bacteriana cecal sofreram transformação logarítmica (Log_{10} UFC) para que os mesmos fossem modulados por uma distribuição normal.

Os parâmetros sanguíneos foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, no mesmo *software* estatístico.

Adicionalmente, o efeito dos níveis de inclusão de prebióticos foi avaliado por teste de regressão, foram considerados significativos os modelos cujo coeficiente de determinação mostrou a possibilidade da obtenção de resultados biológicos adequados ($R^2 > 0,70$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 apresenta os resultados de desempenho das aves. Foi observado efeito dos níveis de prebióticos aos 7 e 21 dias de idade.

Na primeira semana de vida, o tratamento controle positivo, com antibiótico, superou todos os tratamentos prebióticos, exceto no parâmetro viabilidade onde diferenças não foram encontradas. Aos 21 dias de idade o CP ainda apresentou melhor ganho de peso médio total e diário, e peso médio final.

Aos 35 e aos 42 dias de idade não foram observadas diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados. Resultados similares já foram descritos em literatura com diversos outros moduladores de microbiota (APPELT et al., 2010; KHOSRAVI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008).

Os resultados sugerem que existe efeito, apenas na fase de crescimento mais acentuado da ave, até os 21 dias de idade, quando acontece a maturação do tecido absorptivo e da microbiota e, regulação do sistema enzimático intestinal. Os mecanismos de atuação dos antibióticos para controle da microbiota intestinal são imediatos e surtem efeito rapidamente, excluindo a microbiota que consome nutrientes e produz metabólitos depressores de crescimento (NIEWOLD, 2007) melhorando o desempenho das aves com resultados mais constantes que outros moduladores de microflora; ao passo que prebióticos por serem seletores, e não exclusivos de bactérias, tem um período de carência maior para manifestarem seus benefícios. Em um período de crescimento exponencial da ave, essa diferença pode ser o que define a queda no desempenho observada em dietas prebióticas. Ao e Choct (2013), avaliando níveis de FOS e MOS em dietas para frangos de corte, observaram comportamento semelhante.

Tabela 2. Desempenho de frangos de corte recebendo dietas contendo diferentes níveis de prebióticos.

1 a 7 dias							
Variável	CP¹	0,1%²	0,2%	0,3%	0,4%	P value	CV (%)
PMI (g)	45,31	45,47	45,20	45,04	45,04	0,554	1,45
PMF (g/ave)	159,36A	150,46BC	151,76B	144,40C	145,76BC	<0,001	4,84
GP (g)	114,05A	104,99BC	106,56B	99,36C	100,72BC	<0,001	6,89
GPD (g/dia/ave)	16,29A	15,00BC	15,22B	14,19C	14,39BC	<0,001	6,89
CR (g/ave)	139,56B	155,02A	155,13A	152,11A	154,50A	<0,001	4,84
CA (g/g)	1,22B	1,48A	1,46A	1,53A	1,54A	<0,001	9,06
Viabilidade (%)	100,00	100,00	99,60	100,00	100,00	0,418	0,57
1 a 21 dias							
Variável	CP	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	P value	CV (%)
PMF (g/ave)	967,40A	918,04B	930,74B	912,48B	909,71B	<0,001	3,19
GP (g)	922,09A	872,57B	885,54B	867,44B	864,67B	<0,001	3,34
GPD (g/dia/ave)	43,91A	41,55B	42,17B	41,31B	41,17B	<0,001	3,34
CR (g/ave)	1270,18	1249,01	1248,23	1246,11	1248,24	0,621	3,07
CA (g/g)	1,39	1,43	1,42	1,45	1,44	0,051	3,59
Viabilidade (%)	99,2	99,60	99,20	98,00	100,00	0,222	2,00
1 a 35 dias							
Variável	CP	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	P value	CV (%)
PMF (g/ave)	2525,44	2571,41	2572,31	2560,31	2499,02	0,684	5,21
GP (g)	2480,13	2525,95	2527,11	2515,27	2453,98	0,686	5,30
GPD (g/dia/ave)	70,86	72,17	72,20	71,87	70,11	0,686	5,30
CR (g/ave)	3572,61	3538,45	3523,36	3472,94	3516,32	0,175	2,58
CA (g/g)	1,49	1,43	1,43	1,43	1,47	0,468	5,99
Viabilidade (%)	94,78	95,98	95,20	94,00	96,40	0,318	2,90
1 a 42 dias							
Variável	CP	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	P value	CV⁴ (%)
PMF (g/ave)	2957,91	2876,07	2856,66	2892,91	2863,80	0,193	3,61
GP (g)	2912,61	2830,61	2811,46	2847,87	2818,76	0,194	3,67
GPD (g/dia/ave)	69,35	67,40	66,94	67,81	67,11	0,194	3,67
CR (g/ave)	5048,80	5032,74	4959,36	4963,15	5001,49	0,201	2,08
CA (g/g)	1,80	1,83	1,81	1,83	1,82	0,727	2,84
Viabilidade (%)	93,57	94,78	94,80	92,40	95,60	0,290	3,76
FEP³	366,26	354,07	356,62	349,05	359,02	0,572	6,49

PMF, peso médio final; GPD, ganho de peso diário; CR, consumo de ração; CA, conversão alimentar; FEP, fator de eficiência produtiva.

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ³FEP = $(\text{Peso Corporal} \times \text{Viabilidade}) / (\text{Conversão Alimentar} \times \text{Idade de Abate}) \times 100$; ⁴CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%)

Houdijk et al. (1999) relataram que a adição de um composto estranho à microbiota intestinal, ainda que aproveitável pela mesma, pode provocar efeitos indesejáveis por um determinado período de tempo, enquanto a microbiota se adapta e se modifica em resposta às fibras, nesse período o aproveitamento de nutrientes pelo animal pode ser impactado. Assim como o excesso no consumo de um determinado composto de reconhecida ação prebiótica pode causar desequilíbrio nas populações microbianas prejudicando a saúde (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999) e o desempenho animal, causando efeito laxativo e excesso na produção de gases.

Passado o período de adaptação e maturação da microbiota e sistema digestivo, aos 35 e 42 dias, as diferenças desaparecem e os ganhos se assemelham.

No período total de criação a ausência efeito pode estar relacionada, ainda, com os ingredientes que compõem a dieta, com a própria adaptação da microbiota ao composto adicionado ou mesmo com estresse fisiológico e ambiental dos animais. A maioria das dietas formuladas para frangos de corte baseiam-se em cereais e grãos de oleaginosas, ambos contêm em sua composição valores variáveis de polissacarídeos não-amiláceos e oligossacarídeos não-digestíveis, considerando que ambos pertencem a um grupo de moléculas não-digestíveis, mas potencialmente fermentáveis, é suposto que a falta de resposta de um aditivo prebiótico seja decorrente de um efeito diluidor dos próprios compostos da dieta. Muitas vezes, nos próprios grãos e seus subprodutos, os compostos potencialmente fermentáveis são encontrados em concentrações superiores inclusive ao nível de adição da maioria dos prebióticos comerciais. O aumento da viscosidade decorrente destes compostos não digestíveis ainda pode ser responsável por desbalanços no delicado equilíbrio da microflora intestinal, mascarando os possíveis efeitos dos aditivos prebióticos e potencialmente modificando a digestão e absorção (WEALLEANS et al., 2017)

A tabela 3 apresenta os dados de peso relativo de órgãos aos 21 e 42 dias de idade. Não foram observadas diferenças no peso relativo de nenhum dos órgãos selecionados em nenhum dos períodos estudados.

Tabela 3. Peso relativo¹(%) de órgãos de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade recebendo dietas contendo diferentes níveis de prebióticos

	21 dias					P value	CV ⁴ (%)
	Tratamento						
	CP ²	0,1% ³	0,2%	0,3%	0,4%		
Intestino Delgado	6,223	6,501	6,138	6,372	6,143	0,854	11,88
Fígado	2,458	2,390	2,504	2,428	2,391	0,700	7,38
Pâncreas	0,296	0,308	0,317	0,331	0,303	0,574	14,10
Bursa	0,185	0,194	0,182	0,189	0,206	0,708	18,50
Proventrículo	0,497	0,490	0,522	0,550	0,507	0,518	14,30
Moela	1,868	1,820	2,002	2,030	2,067	0,085	11,02
Baço	0,079	0,084	0,092	0,092	0,098	0,605	27,48
	42 dias						
Intestino Delgado	3,480	3,737	3,560	3,850	3,538	0,196	9,79
Fígado	1,602	1,784	1,696	1,806	1,735	0,185	10,67
Pâncreas	0,167	0,153	0,159	0,158	0,152	0,376	10,36
Bursa	0,128	0,124	0,121	0,140	0,159	0,214	26,96
Proventrículo	0,257	0,273	0,276	0,261	0,263	0,932	18,17
Moela	1,275	1,252	1,324	1,244	1,253	0,868	12,46
Baço	0,084	0,085	0,078	0,088	0,081	0,855	21,34

¹Peso relativo de órgãos (%) = (peso do órgão, g/peso vivo, g) x100; ²CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ³porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁴CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

A não alteração do peso dos órgãos indica que quatro níveis suplementados não apresentaram efeitos adversos nas funções dos órgãos internos dos frangos de corte até o período total de criação. Resultados semelhantes foram relatados por Abdel-Raheem e Abd-Allah (2011), que observaram que frangos alimentados com MOS, *Saccharomyces cerevisiae* e sua combinação como simbiótico, não apresentaram diferenças no peso de órgãos. Ashayerizadeh et al. (2009) também relataram que os pesos do coração, fígado e pâncreas não foram significativamente diferentes em frangos de corte suplementados com prebiótico (Biolex®-MB), probiótico (PrimaLac®) e sua mistura como simbiótico.

As tabelas 4 e 5 apresentam os dados de altura das vilosidades, profundidade de cripta, relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais (GC e IEL, respectivamente) do duodeno, jejuno e íleo, aos 21 e 42 dias de idade das aves.

No segmento duodeno aos 21 dias de idade, os níveis 0,1, 0,2 e 0,4% apresentaram maiores alturas de vilosidades, diferindo do controle positivo; quanto às profundidades de cripta as maiores foram mensuradas no nível de 0,2% de inclusão e as menores no controle positivo. Embora não apresente as maiores vilosidades, o controle apresentou

melhor relação vilosidade:cripta em função da baixa extensão de suas criptas, assemelhando-se a 0,1 e 0,4%.

Tabela 4. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.

Item	Tratamento					P value	CV ³ (%)
	CP ¹	0,1% ²	0,2%	0,3%	0,4%		
Duodeno							
AV, μm	1435,90B	1529,10A	1548,70A	1455,50B	1572,60A	<0,001	12,64
PC, μm	149,09C	172,51B	193,18A	173,65B	179,50AB	<0,001	21,79
V:C	9,95A	9,27AB	8,31C	8,70BC	8,88ABC	<0,001	24,79
GC, n/mm ²	1774,85A	1403,9AB	1383,74AB	1309,45AB	1153,93B	0,038	26,03
IEL, n/mm ²	236,07	286,10	406,47	338,86	436,15	0,078	30,67
Jejuno							
AV, μm	917,20A	829,40BC	879,70AB	764,10C	910,80AB	<0,001	24,94
PC, μm	128,44AB	118,38B	139,12A	122,77B	127,02AB	<0,001	25,53
V:C	7,41A	7,31A	6,59BC	6,43C	7,29AB	<0,001	24,60
GC, n/mm ²	1366,06	1694,84	1392,41	1841,13	1743,81	0,121	23,91
IEL, n/mm ²	555,41	598,70	555,34	478,55	491,15	0,651	19,22
Íleo							
AV, μm	567,10BC	609,80B	665,50A	604,2B	528,00C	<0,001	24,70
PC, μm	102,30C	121,68AB	113,85B	114,40B	128,03A	<0,001	23,23
V:C	5,69A	5,07B	6,02A	5,49AB	4,27C	<0,001	28,31
GC, n/mm ²	2579,58A	1856,41BC	1550,63BC	2013,13B	1365,31C	<0,001	27,85
IEL, n/mm ²	488,22	515,90	548,67	454,61	508,00	0,712	15,22

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ³CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

Quanto a densidade de células caliciformes no duodeno aos 21 dias, apenas o nível de 0,4% diferiu do controle positivo com a menor densidade.

No jejuno, as maiores vilosidades foram observadas no tratamento controle positivo, 0,2 e 0,4% de inclusão de prebióticos. As menores profundidades de cripta no tratamento 0,1% e 0,3%, as maiores no tratamento 0,2%, comprando-se os valores pelo teste de Dunnett, o nível 0,1% diferiu significativamente do controle com criptas menores e o nível 0,2% com criptas maiores.

A densidade de GC no jejuno não diferiu entre os tratamentos.

No íleo, ainda aos 21 dias, as maiores vilosidades foram encontradas em 0,2% de inclusão, e as menores em 0,4%. Quanto às criptas, 0,2% difere apenas de 0,1 e 0,3. As melhores relações V:C foram observadas nos tratamentos CP, 0,1 e 0,4%.

A densidade de GC foi significativamente alterada sendo que todos os tratamentos prebióticos diferem do controle, com menores densidades.

Nos três segmentos não há diferenças na densidade de linfócitos intraepiteliais.

Niewold (2007) afirma que um dos possíveis mecanismos de atuação dos antibióticos é reduzindo a espessura da parede intestinal, facilitando o transporte de nutrientes pelo epitélio, o que em parte justifica a redução de vilosidades no duodeno.

A expressão de mucina, e células caliciformes, são associadas à maturidade absorptiva intestinal e proteção do epitélio (FORDER et al., 2007), o aumento de GC no controle positivo pode inclusive ser relacionado à melhora no desempenho, uma vez que o intestino dessas aves era mais maduro para digerir e absorver.

No segmento duodeno aos 42 dias de idade (Tabela 5), apenas os níveis 0,1 e 0,2% diferem do controle e demais tratamentos com menores vilosidades. Nas criptas, as maiores medidas foram observadas nos mesmos tratamentos supracitados, entretanto o controle, nesse caso, não difere das dietas prebióticas. Quanto às relações V:C, apenas difere 0,1% do CP e 0,4%. A densidade de células caliciformes não diferiu entre tratamentos. A densidade de IEL, neste segmento, não diferiu entre dietas prebióticas e, com exceção de 0,3% de inclusão, nenhum nível difere do antibiótico.

Tabela 5. Altura das vilosidades (AV), profundidade de cripta (PC), relação vilosidade/cripta (VC), densidade de células caliciformes (GC) e densidade de linfócitos intraepiteliais (IEL) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.

Item	Tratamento					P value	CV ³ (%)
	CP ¹	0,1% ²	0,2%	0,3%	0,4%		
Duodeno							
AV, μm	1659,90A	1447,00B	1407,40B	1679,10A	1727,70A	<0,001	15,74
PC, μm	164,10AB	158,19B	154,15B	175,56A	175,00A	<0,001	21,42
V:C	10,34A	9,32B	9,45AB	10,05AB	10,28A	0,007	23,16
GC, n/mm ²	1717,25	1374,87	1454,71	1478,5	1166,05	0,092	24,42
IEL, n/mm ²	325,74B	362,17AB	373,18AB	413,08A	376,57AB	0,006	9,16
Jejuno							
AV, μm	1030,20A	782,70C	919,10B	922,30B	923,70B	<0,001	25,93
PC, μm	125,89A	111,95B	121,19AB	130,40A	135,28A	<0,001	25,72
V:C	8,44A	7,23B	7,94AB	7,32B	7,08B	<0,001	28,15
GC, n/mm ²	1650,28	1874,75	2037,19	1643,72	1710,09	0,243	19,89
IEL, n/mm ²	576,40A	534,82AB	503,92B	479,48B	513,73AB	0,009	7,66
Íleo							
AV, μm	672,90A	548,10B	505,80B	648,90A	647,20A	<0,001	31,61
PC, μm	112,93A	99,85BC	97,45C	109,43AB	100,46BC	<0,001	24,08
V:C	5,97ABC	5,56BC	5,28C	6,30AB	6,61A	<0,001	34,09
GC, n/mm ²	1584,89B	2864,42A	2226,02AB	1852,65B	1997,65AB	0,012	32,47
IEL, n/mm ²	507,88	505,24	504,12	504,63	489,34	0,936	5,05

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ³CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

No segmento jejuno, o tratamento CP apresentou as maiores vilosidades, diferindo de todos os outros tratamentos; considerando o papel do jejuno como maior zona de absorção do intestino delgado, podemos inferir redução na absorção de nutrientes nas dietas prebióticas, entretanto sem alterações no desempenho. Nas criptas, as diferenças são menos acentuadas, apenas o nível de 0,1% diferindo do controle, que apresentou as maiores criptas. A relação V:C de CP apresenta o melhor valor, apenas o nível 0,2% não difere deste. A densidade de células caliciformes, novamente, não difere entre tratamentos. A densidade dos IEL do CP, neste segmento, difere de 0,2 e 0,3%.

No íleo, os níveis 0,1 e 0,2% diferem do CP com menores vilosidades. Quanto às profundidades de criptas, os níveis citados acima permanecem diferindo do CP, entretanto com menores criptas, embora seja oportuno destacar que a diferença, mesmo estaticamente significativa, é, em termos absolutos, de baixa variabilidade. A densidade de células caliciformes reflete o possível aumento na carga microbiana em certos tratamentos prebióticos, o nível 0,1% difere do controle com maior densidade calculada.

Parecer haver uma relação inversa entre densidade de GC e IEL, no caso do íleo, não há diferenças na densidade de IEL, ao contrário dos demais segmentos.

A maturação do enterócito nos variados segmentos intestinais e sua capacidade de digestão e absorção são extremamente dependentes da velocidade adequada de sua migração das criptas e ao longo do vilão, onde continua ocorrendo a aquisição de suas funções fisiológicas, num processo constante de migração – maturação – morte celular. Por esse motivo, maiores vilosidades, tradicionalmente associadas a maior taxa de absorção, não necessariamente refletem em melhor desempenho animal, uma vez que a necessidade de renovação aumentada no vilão e consequente aumento das criptas pode ocasionar a migração de células com baixa funcionalidade.

Elevados níveis de fibras na dieta, inclusive as consideradas funcionais, ainda trazem risco de abrasão à mucosa (MONTANHINI NETO; CECCANTINI; FERNANDES, 2013), aumentando a necessidade de reposição celular no intestino, gerando, além do risco de atividade absorptiva reduzida, um dispêndio excessivo de energia, o que pode parcialmente justificar o porquê de altos níveis de prebióticos não modificarem o desempenho ou reduzirem a altura de vilosidade em diversos segmentos.

Na tabela 6 estão expostos os valores das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal aos 42 dias de idade. Não foi possível identificar diferenças estatísticas entre os tratamentos, a grande variabilidade dos dados pode ter mascarado os efeitos dos tratamentos.

Os ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o ácido butírico, da fermentação de carboidratos pela microflora intestinal, são conhecidos por reduzir o pH do conteúdo intestinal e possuem propriedades antibacterianas (BOHNHOFF; MILLER; MARTIN, 1964; MEYNELL, 1963).

O acetato é o AGCC mais produzido pela fermentação bacteriana, como observado no presente estudo. O acetato, por ser menos metabolizado no enterócito rapidamente é transportado ao fígado (COOK; SELLIN, 1998) participa dos ciclos de lipogênese e colesterogênese, o propionato é competidor nos sítios de absorção do acetato, de maneira que seu efeito metabólico é contrário ao acetato, ou seja, redução da lipogênese; a relação acetato:propionato é decisiva, então, quanto a rota metabólica a ser ativada.

Tabela 6. Ácidos graxos de cadeia curta em conteúdo cecal de frangos de corte recebendo dietas contendo níveis de prebióticos.

		Tratamento					<i>P value</i>	CV ³ (%)
		CP ¹	0,1% ²	0,2%	0,3%	0,4%		
mM/Kg	Acetato	253,83	302,16	336,72	236,83	280,38	0,199	32,03
	Propionato	12,77	6,37	6,57	5,37	4,02	0,159	103,86
	Butirato	18,26	4,03	2,66	10,21	11,44	0,649	213,3
%Molar	Acetato	92,02	96,96	97,44	94,74	95,38	0,497	6,55
	Propionato	1,77	2,31	1,92	2,14	2,49	0,781	54,92
	Butirato	4,83	0,98	0,73	4,16	2,13	0,498	199,96

¹CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ²porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos. ³CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

O butirato, por sua vez, é fonte de energia de rápido aproveitamento no enterócito. Em termos absolutos a quantidade de butirato no tratamento controle é superior aos demais tratamentos, o que pode ser indicativo de maior saúde dos enterócitos, embora não possa ser inferido com segurança que as diferenças nas vilosidades intestinais possam ser resultantes do maior aporte de energia às células via produção desse AGCC.

A relação acetato/propionato no tratamento controle é de aproximadamente 19,87, em comparação à 47,4; 51,26; 44,14 e 69,76 seguindo a ordem crescente de inclusão de prebióticos. Embora parâmetros de carcaça não tenham sido alvo desse estudo, essa relação pode interferir diretamente na deposição de gordura no produto final.

As tabelas 7 e 8 apresentam os dados relativos à hematologia: diferencial de leucócitos, relação heterofilo:leucócito, juntamente com a área cortical de Bursa. A porcentagem de córtex da Bursa de Fabricius foi apresentada nas mesmas tabelas devido à importância desse órgão na hematopoese e consequente formação de componentes sanguíneos.

Foi possível identificar apenas uma diferença significativa nos parâmetros sanguíneos, no percentual de trombócitos aos 21 dias de idade.

Os trombócitos de frangos de corte são os equivalentes às plaquetas nos mamíferos, como tal, são responsáveis pela liberação da serotonina em resposta à trombina ou ao colágeno (SCHMAIER et al., 2011). A serotonina, por sua vez, induz vasoconstrição, agregação de trombócitos e coagulação sanguínea (CHAPMAN; TAYLOR; WIDEMAN, 2008; LACOSTE-ELEAUME et al., 1994; STILLER; BELAMARICH; SHEPRO, 1975).

Os trombócitos aviários diferem das plaquetas de mamíferos pela sua incapacidade de formar agregados resistentes ao cisalhamento e seus níveis muito mais baixos de integrina, uma proteína necessária para a formação de agregados (SCHMAIER et al., 2011). Os trombócitos de aves são considerados parte do sistema de defesa inata e apresentam atividade fagocítica contra bactérias (CARLSON; SWEENEY; TOKARYK, 1968). Embora estatisticamente diferentes, o coeficiente de variação da análise

O percentual de córtex da Bursa aos 21 dias diferiu significativamente entre os tratamentos, os menores percentuais são encontrados no controle positivo e 0,1% de inclusão de prebióticos.

Tabela 7. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.

Tratamento	LINF ¹	HET ²	MONO ³	EOSIN ⁴	BASOF ⁵	TROMB ⁶	H/L ⁷	Córtex (%)
CP ⁸	52,17	7,50	5,00	1,00	0,17	34,20A	0,18	46,79B
0,1% ⁹	73,50	5,67	2,83	1,50	0,67	15,80AB	0,20	45,77B
0,20%	73,17	13,00	7,67	3,33	1,17	1,67AB	0,24	50,57A
0,30%	79,83	9,67	3,50	1,00	2,00	4,00B	0,13	49,23A
0,40%	75,17	13,67	3,00	0,33	1,17	6,67AB	0,18	51,14A
<i>P value</i>	0,176	0,236	0,620	0,439	0,221	0,024	0,495	<0,001
CV ¹⁰ (%)	30,95	82,29	123,56	168,6	149,24	171,29	112,99	11,64

¹LINF: linfócito; ²HET: heterófilo; ³MONO: monócito; ⁴EOSIN: eosinófilo; ⁵BASOF: basófilo; ⁶TROMB: trombócitos; ⁷H/L: relação heterófilo:linfócito; ⁸CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ⁹ porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ¹⁰CV, coeficiente de variação. Médias de parâmetros sanguíneos seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (5%).

Embora seja comum supor que maiores percentuais de córtex e maior contagem de trombócitos reflitam em maiores produções de anticorpos, resultando em sistemas de defesa mais eficientes e melhor saúde e desempenho das aves, neste estudo o desempenho não foi superior em aves com maiores percentuais de córtex. A diminuição no córtex do tratamento controle dá-se provavelmente pela redução do desafio bacteriano intestinal promovida pelo antibiótico, portanto baixo contato com antígenos e menor necessidade de produção de anticorpos.

É importante observar que aos 42 dias de idade, os percentuais de córtex reduzem em todos os tratamentos, naturalmente pela própria involução do órgão ao longo da vida do frango de corte.

Tabela 8. Valores hematológicos (%), relação heterófilo:linfócito (H:L) e percentual de área cortical da Bursa de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de prebióticos.

Tratamento	LINF ¹	HET ²	MONO ³	EOSIN ⁴	BASOF ⁵	TROMB ⁶	H/L ⁷	Córtex (%)
CP⁸	65,33	23,83	2,00	4,50	1,00	3,33	0,48	45,24B
0,1%⁹	61,50	26,67	3,33	3,33	0,67	4,50	0,45	45,63AB
0,20%	47,50	32,50	2,50	6,00	3,17	8,33	1,25	45,46AB
0,30%	52,00	25,50	2,67	5,33	2,00	12,50	0,53	45,23B
0,40%	58,00	25,83	3,50	2,67	2,33	7,67	0,51	48,79A
P value	0,202	0,783	0,662	0,369	0,067	0,388	0,541	0,015
CV¹⁰ (%)	27,19	43,62	67,89	91,7	110,11	127,92	137,48	14,48

¹LINF: linfócito; ²HET: heterófilo; ³MONO: monócito; ⁴EOSIN: eosinófilo; ⁵BASOF: basófilo; ⁶TROMB: trombócitos; ⁷H/L: relação heterófilo:linfócito; ⁸CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ⁹porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ¹⁰CV, coeficiente de variação. Médias de parâmetros sanguíneos seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (5%).

A Tabela 9 mostra os resultados de microbiologia cecal: contagem de unidades formadoras de colônia de *E. coli* e atividade inibitória de substâncias antagônicas produzidas pelas amostras do *pool* de bactérias ácido-láticas (LAB) cecais frente à *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, sendo possível constatar que houve alteração significativa nas duas variáveis.

O controle positivo não diferiu dos tratamentos prebióticos, enquanto, entre estes, 0,3 e 0,4% diferem de 0,1%, que apresentou o menor número de UFC. O maior halo de inibição foi encontrado em 0,2% de inclusão, os demais tratamentos não diferiram entre si.

Os ácidos orgânicos produzidos pelas LAB, incluindo o ácido lático, acético e propiônico cecais, exercem efeitos antimicrobianos devido à sua ação na membrana citoplasmática bacteriana, interferindo na manutenção do potencial de membrana e inibindo o transporte ativo de moléculas (DE VUYST; VANDAMME, 1994; DE VUYST, 2007), observa-se que o tratamento 0,2% de inclusão apresenta uma das menores contagens de *E. coli* e maior halo de inibição frente à *S. Heidelberg*, inferimos que as LAB selecionadas possam ter maior produção de metabolitos antimicrobianos ou maior capacidade de crescimento competitivo.

A redução na população de *E. coli*, mesmo sendo constituinte da microbiota natural do organismo, é interessante pois a bactéria pode ser considerada patogênica em virtude de seus mecanismos de virulência e oportunismo (SENISE; CAMPANHA, 2017).

Tabela 9. Contagem de unidades formadoras de colônia de *E. coli* cecal e halos de inibição de bactérias ácido láticas(*) contra *Salmonella enterica* serovar Heidelberg de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes combinações de prebióticos.

	CP ³	0,1% ⁴	0,2%	0,3%	0,4%	<i>P value</i>	CV ⁵ (%)
<i>E. coli</i> ¹	7,141AB	6,550B	6,782AB	7,289A	7,316A	0,004	10,54
<i>Halos</i> ²	0,69B	0,78B	2,31A	0,76B	0,81B	<0,001	62,02

*Pool de bactérias ácido láticas. ¹Valores expressos em Log10 UFC. ²Valores expressos em milímetros. ³CP, controle positivo, com antibiótico (avilamicina 20%, 50 ppm de inclusão); ⁴porcentagem de inclusão da combinação de mananos, β glucanos, frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos; ⁵CV, coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (5%).

5. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que é possível a substituição dos antibióticos melhoradores de desempenho por prebióticos sem prejuízo ao desempenho das aves.

Não há indícios de que o aumento na quantidade de material potencialmente fermentativo pela microbiota melhore significativamente o desempenho e saúde das aves, de maneira que, considerando o fator custo da suplementação, o nível de 0,1% é satisfatório.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHEEM, S. M.; ABD-ALLAH, S. M. S. The effect of single or combined dietary supplementation of mannan oligosaccharide and probiotics on performance and slaughter characteristics of broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 11, p. 854–862, 1 nov. 2011.
- ADOBE PHOTOSHOP CREATIVE CLOUD. Versão 19.1.4. San Jose, CA: Adobe Systems Incorporated, 2018.
- AO, Z.; CHOCT, M. Oligosaccharides affect performance and gut development of broiler chickens. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 26, n. 1, p. 116–21, jan. 2013.
- APPELT, M. D.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; SILVA, W. T. M. da; VENTURI, I.; NUNES, C. G. V. Níveis de probiótico em rações de origem animal e vegetal para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 765–771, abr. 2010.
- ASHAYERIZADEH, A.; DABIRI, N.; ASHAYERIZADEH, O.; MIRZADEH, K. H.; ROSHANFEKR, H.; MAMOOEE, M. Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and

- hematological indices of broiler chickens. **Pakistan journal of biological sciences : PJBS**, v. 12, n. 1, p. 52–7, 1 jan. 2009.
- BOHNHOFF, M.; MILLER, C. P.; MARTIN, W. R. RESISTANCE OF THE MOUSE'S INTESTINAL TRACT TO EXPERIMENTAL *SALMONELLA* INFECTION. I. FACTORS WHICH INTERFERE WITH THE INITIATION OF INFECTION BY ORAL INOCULATION. **The Journal of experimental medicine**, v. 120, p. 805–16, 1 nov. 1964.
- CARLSON, H. C.; SWEENEY, P. R.; TOKARYK, J. M. Demonstration of phagocytic and trephocytic activities of chicken thrombocytes by microscopy and vital staining techniques. **Avian diseases**, v. 12, n. 4, p. 700–15, nov. 1968.
- CHAPMAN, M. E.; TAYLOR, R. L.; WIDEMAN, R. F. Analysis of Plasma Serotonin Levels and Hemodynamic Responses Following Chronic Serotonin Infusion in Broilers Challenged with Bacterial Lipopolysaccharide and Microparticles. **Poultry Science**, v. 87, n. 1, p. 116–124, 1 jan. 2008.
- CHARLES NORIEGA, M. I. V. C. Apuntes de hematología aviar: Material didáctico para curso de hematología aviária. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. 2000. 70 p. Apostila.
- COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 499–507, jun. 1998.
- DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 194–199, 2007.
- DE VUYST, L.; VANDAMME, E. **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications**. London, 1994.
- ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.
- FORDER, R. E. A.; HOWARTH, G. S.; TIVEY, D. R.; HUGHES, R. J. Bacterial Modulation of Small Intestinal Goblet Cells and Mucin Composition During Early Posthatch Development of Poultry. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2396–2403, 1 nov. 2007.
- HARRIS, L. J.; DAESCHEYL, M. A.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 52, p.384–887, 1999;.
- HOUDIJK, J. G.; BOSCH, M. W.; TAMMINGA, S.; VERSTEGEN, M. W.; BERENPAS, E. B.; KNOOP, H. Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. **Journal of animal science**, v. 77, n. 1, p. 148–58, jan. 1999.
- KHOSRAVI, A.; BOLDAJI, F.; DASTAR, B.; HASANI, S. Immune Response and Performance of Broiler Chicks Fed Protexin and Propionic Acid. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 188–191, 1 fev. 2010.

- LACOSTE-ELEAUME, A.-S.; BLEUX, C.; QUÉRÉ, P.; COUDERT, F.; CORBEL, C.; KANELLOPOULOS-LANGEVIN, C. Biochemical and Functional Characterization of an Avian Homolog of the Integrin GPIIb-IIIa Present on Chicken Thrombocytes. **Experimental Cell Research**, v. 213, n. 1, p. 198–209, jul. 1994.
- MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, 4 set. 2007.
- MEYNELL, G. G. Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of Eh and volatile fatty acids in the normal gut. **British journal of experimental pathology**, v. 44, p. 209–19, abr. 1963.
- MINITAB 18 STATISTICAL SOFTWARE. State College, PA: Minitab, Inc., 2017.
- MONTANHINI NETO, R.; CECCANTINI, M.; FERNANDES, J. Immune response of broilers fed conventional and alternative diets containing multi-enzyme complex. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 15, n. 3, p. 223–231, set. 2013.
- NIEWOLD, T. a. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry science**, v. 86, n. 4, p. 605–9, abr. 2007.
- OLIVEIRA, M. C.; RODRIGUES, E. A.; MARQUES, R. H.; GRAVENA, R. A.; GUANDOLINI, G. C.; MORAES, V. M. B. Performance and morphology of intestinal mucosa of broilers fed mannan-oligosaccharides and enzymes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 442–448, abr. 2008.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, n. 1, p. 329-334, 1947.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição dos alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2011. 252p.
- SCHMAIER, A. A.; STALKER, T. J.; RUNGE, J. J.; LEE, D.; NAGASWAMI, C.; MERICKO, P.; CHEN, M.; CLICHE, S.; GARIEPY, C.; BRASS, L. F.; HAMMER, D. A.; WEISEL, J. W.; ROSENTHAL, K.; KAHN, M. L. Occlusive thrombi arise in mammals but not birds in response to arterial injury: evolutionary insight into human cardiovascular disease. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 3661–3669, 29 set. 2011.
- SENISE, D.; CAMPANHA, A. COLIBACILOSE AVIÁRIA EM FRANGOS DE CORTE: REVISÃO DE LITERATURA. 2017.
- SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.983-990, 2003.
- STILLER, R.; BELAMARICH, F.; SHEPRO, D. Aggregation and release in thrombocytes of the duck. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 229, n. 1, p. 206–210, jul. 1975.
- WEALLEANS, A. L.; WALSH, M. C.; ROMERO, L. F.; RAVINDRAN, V. Comparative effects of two multi-enzyme combinations and a Bacillus probiotic on

growth performance, digestibility of energy and nutrients, disappearance of non-starch polysaccharides, and gut microflora in broiler chickens. **Poultry science**, v. 96, n. 12, p. 4287–4297, 1 dez. 2017.

CAPÍTULO IV

1. IMPLICAÇÕES

Embora as pesquisas com prebióticos, probióticos e simbióticos não sejam novidade na nutrição animal nos estudos apresentados encontramos uma situação pouco explorada: a possibilidade de estudar diferentes fontes de prebióticos em combinações, proporções e níveis variados. Entretanto, embora as combinações de fontes sejam raras na literatura, ao contrário de extratos de plantas e óleos essenciais por exemplo, os resultados com prebióticos são muito mais consistentes em termos de resultados que os demais aditivos substitutos de antibióticos. Ainda comparativamente a alguns aditivos consolidados na indústria animal, como enzimas, os estudos com eubióticos ainda apresentam amplos horizontes em virtude da seleção genética de novos probióticos, técnicas de obtenção e purificação de prebióticos cada vez mais modernas e as incontáveis combinações simbióticas já a venda no mercado.

Baseados em princípios de precaução, diversos governos têm banido a utilização de antibiótico em dose subterapêuticas na produção animal, e esse é um caminho sem volta, as pesquisas com aditivos substitutos nunca foram tão demandadas e importantes. Embora não sejam observados nos estudos apresentados melhoras no desempenho das aves, o simples fato dos prebióticos não deprimirem os ganhos já é de grande importância, e a possibilidade de estimular crescimento intestinal, produção de muco e deslocamento de linfócitos nos segmentos intestinais é grande indicativo de funcionalidade dos aditivos estudados e sinal de saúde nos animais.

O desafio sanitário ainda demonstrou que, sob baixa carga microbiana, os efeitos de quaisquer aditivos podem ser anulados. Uma limitação observada em diversos relatos de literatura, observamos que os laboratórios das universidades ou centros de pesquisa podem não ser os mais adequados quando pretendemos demonstrar efeitos de aditivos que só podem ser encontrados em condições de campo, onde o desafio sanitário é conhecido e maior. Embora diferenças nos halos de inibição tenham sido encontrados e seja tentador afirmar que essas medidas indicam seleção de cepas de bactérias ácido lácticas e maior resistência à *Salmonella*, é extremamente perigoso recomendar um aditivo baseado nessa medida apenas e que pode variar intensamente em função de condições de campo. Isso levanta questionamentos e estudos mais profundos, para avaliar qual a resposta, seja em desenvolvimento, formação de tecido linfóide e status imunológico, que

aves apresentariam à suplementação de oligossacarídeos dependendo das condições de criação.

Os eubióticos são uma realidade em campo e apresenta grande potencial na indústria animal além de consistência nos resultados, futuras pesquisas devem priorizar a reprodução fiel de condições de campo, assegurando o desafio sanitário e permitindo aos animais alimentados com o aditivo explorar todo seu potencial.