

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PROBIÓTICO *IN OVO* SOBRE A
MORFOMETRIA INTESTINAL E CONTROLE DE *Salmonella* Enteritidis

BRUNA BOARO MARTINS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Zootecnia como parte
dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em
Zootecnia, Área de
Concentração Nutrição e
Produção Animal.

BOTUCATU - SP

Março – 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PROBIÓTICO *IN OVO* SOBRE A
MORFOMETRIA INTESTINAL E CONTROLE DE *Salmonella* Enteritidis

BRUNA BOARO MARTINS
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Ariel Antonio Mendes

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Zootecnia como parte
dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em
Zootecnia, Área de
Concentração Nutrição e
Produção Animal.

BOTUCATU – SP
Março – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Boaro Martins, Bruna.

Efeito da inoculação de probiótico in ovo sobre a morfometria intestinal e controle de Salmonella Enteritidis / Bruna Boaro Martins. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ariel Antonio Mendes

Capes: 50405004

1. Frango de corte. 2. Salmonella enteritidis - Controle. 3. Probióticos. 4. Inoculação. 5. Sistema gastrointestinal.

Palavras-chave: Aditivos alternativos; Exclusão competitiva; Frango de corte; Nutrição in ovo; Trato gastrointestinal.

Dedico

Sobretudo a Deus,

Por me dar forças e proteção durante essa caminhada, fortalecendo meu coração nos momentos de dificuldades e por iluminar meu caminho de tal forma que pude ter passos firmes em busca dos meus objetivos.

À minha mãe,

Márcia Regina Fernandes Boaro Martins, minha inspiração sem a qual nada disso faria sentido. Obrigada por ser essa estrela guia em minha vida, com certeza o mérito das minhas conquistas eu devo muito a você, sem dúvidas você é a melhor amiga, companheira, mestre que eu poderia ter; acima de tudo meu exemplo de vida.

Agradeco

Ao meu anjo de guarda, pela fidelidade de estar sempre ao meu lado me guiando.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ariel Antonio Mendes, do Departamento de Produção Animal da FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu, por ser um grande incentivador da minha carreira acadêmica, obrigada por acreditar em mim mais uma vez, depositando sua confiança no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus familiares, meu pai Augusto Pedro Martins, meus tios Carmen Silvia Fernandes Boaro e Paulo Roberto Rossetto, pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar este trabalho e aprimorar meus conhecimentos e aos seus funcionários, Seila Cristina Cassinele Vieira e Ellen Cassimiro Guilhen, pelo auxílio prestado.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, pelos ensinamentos e experiências trocadas durante o curso de mestrado.

Aos funcionários da Fazenda Lageado, em especial ao Carlos Godoy pelo grande auxílio na condução do experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio Financeiro e Bolsa de estudos.

Aos amigos, Édina de Fátima Aguiar, Rinaldo José Ortiz, Luiz Gustavo Bicas Barbosa, obrigada pela ajuda durante todo o desenvolvimento desse trabalho, foi de extrema importância.

À empresa BioCamp, pela oportunidade de trabalhar em parceria, só levo bons frutos que contribuíram de forma ímpar para o meu crescimento profissional. Obrigada Ivan

Lee, Paulo Martins e Bauer Alvarenga pela confiança em meu trabalho e pelas experiências trocadas.

Ao Dr. Guilherme Castro e sua equipe do Instituto Biológico de Descalvado, por estarem sempre de portas abertas para me receberem, obrigada pelo auxílio prestado nas análises microbiológicas.

Aos professores Raphael Lucio Andreatti Filho e Adriano Sakai Okamoto do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu pelas amostras de Salmonella cedidas e pelos esclarecimentos de tantas dúvidas.

À professora Maria Márcia Pereira Sartori, pela ajuda nas análises estatísticas.

À todos que aqui não foram citados nominalmente, mas que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigada!

Sumário

	página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. Introdução geral.....	2
2. Revisão de literatura	4
2.1 Desenvolvimento do trato gastrintestinal no período final de incubação e pós-eclosão.....	4
2.2 <i>Salmonella</i> spp.....	5
2.3 Probióticos	6
3. Referências	9
CAPÍTULO 2 - EFEITO DE DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE.....	15
Resumo	16
Abstract	17
Introdução	18
Material e Métodos.....	20
1. Desempenho.....	26
2. Biometria entérica.....	26
3. Rendimento de carcaça.....	27
4. Análise estatística.....	27
Resultados e Discussão	28
1. Desempenho.....	28
2. Biometria entérica.....	31
3. Rendimento de carcaça.....	37
Conclusão	38
Referências.....	39

	página
CAPÍTULO 3 -HISTOMORFOMETRIA E ULTRAESTRUTURA DA MUCOSA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO E DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Enteritidis	44
Resumo	45
Abstract	46
Introdução	47
Material e Métodos.....	49
1. Histomorfometria entérica e contagem do número de células calciformes e enterócitos na mucosa intestinal.....	52
2. Avaliação ultraestrutural da integridade entérica.....	53
3. Análise microbiológica.....	53
4. Análise estatística.....	54
Resultados e Discussão	55
1. Histomorfometria entérica e contagem do número de células calciformes e enterócitos na mucosa intestinal.....	55
1.1 Histomorfometria entérica	55
1.2 Contagem do número de células calciformes e enterócitos	57
2. Avaliação ultraestrutural da integridade entérica.....	61
3. Avaliação microbiológica do conteúdo cecal.....	72
Conclusão	74
Referências.....	75
 CAPÍTULO 4 - IMPLICAÇÕES.....	 80
Implicações.....	81

Lista de Tabelas

	página
CAPÍTULO 2 - EFEITO DE DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE	15
Tabela 1 – Composições centesimais e nutricionais calculadas das rações basais	25
Tabela 2 – Peso inicial (PI), Peso final (PF), Ganho de peso (GP), Consumo de ração (CR), Conversão Alimentar (CA), Viabilidade (VB) e Índice de eficiência produtiva (IEP) de frangos de corte aos 7, 21, 35 e 42 dias de idade submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico.....	30
Tabela 3 – Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento.....	32
Tabela 4 – Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 7 dias de idade	33
Tabela 5 – Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 21 dias de idade	34
Tabela 6 – Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 35 dias de idade	35
Tabela 7 – Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 42 dias de idade	36
Tabela 8 – Rendimento de carcaça de frangos de corte aos 42 dias de idade submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico.....	38
CAPÍTULO 3 -HISTOMORFOMETRIA E ULTRAESTRUTURA DA MUCOSA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO E DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Enteritidis	44
Tabela 1 – Composições centesimais e nutricionais calculadas das rações basais	51
Tabela 2 – Valores médios da morfometria entérica de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	56

	página
Tabela 3 – Contagem do número de células calciformes nos segmentos de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	59
Tabela 4 – Contagem do número de enterócitos nos segmentos de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis... ..	60
Tabela 5 – Contagem de <i>Salmonella</i> spp. (UFC/g) aos 7 dias de idade em conteúdo cecal de frangos de corte desafiados via intraesofágica ao 3º dia de idade por <i>Salmonella</i> Enteritidis	74

Lista de Figuras

	página
CAPÍTULO 2 - EFEITO DE DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE	15
Figura 1 – Ovos oriundos de matrizes Cobb® com 39 semanas, marcados com cores diferentes de acordo com os tratamentos utilizados, (vermelho) T1 (controle): pintos provenientes de ovos vacinados <i>in ovo</i> no 18º dia de incubação contra a doença de Marek; (verde) T2: pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico no 18º dia de incubação utilizando como diluente a vacina de Marek; (roxo) T3: pintos provenientes de ovos vacinados <i>in ovo</i> no 18º dia de incubação contra a doença de Marek e pulverizados ao nascimento com solução contendo probiótico comercial (o mesmo utilizado para a inoculação <i>in ovo</i>)	20
Figura 2 – Transferência dos ovos no 18º dia de incubação. Em (A) e (B) preparação da vacina de Marek; (C) ovoscopia; (D) acoplamento da vacina na máquina injetora; (E) teste da injetora; (F) máquina injetora; (G) ovos introduzidos na máquina injetora; (H) momento da inoculação dos ovos; (I) ovos já vacinados transferidos para caixa de nascimento	21
Figura 3 – Em (A) aves selecionadas e sexadas após o nascimento recebendo solução contendo probiótico pulverizado via spray; (B) aves saindo da máquina pulverizadora.....	22
Figura 4 – Aviário experimental da FMVZ/UNESP Campus de Botucatu: Em (A) corredor central; (B) boxe padrão do aviário; (C) boxe equipado com comedouro e bebedouro pendular e ventilador e (D) boxe com comedouro infantil e campânula elétrica de aquecimento.....	23
Figura 5 – Controle de temperatura ambiente registrada diariamente durante o período experimental.....	24
Figura 6 – Controle de umidade do ar registrada diariamente durante o período experimental.....	24
CAPÍTULO 3 -HISTOMORFOMETRIA E ULTRAESTRUTURA DA MUCOSA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO E DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Enteritidis.	44

- Figura 1 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 1 dia de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 1600X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.....64
- Figura 2 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 7 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X65
- Figura 3 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 7 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.....66
- Figura 4 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 21 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X67
- Figura 5 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 21 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.....68
- Figura 6 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 35 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X69

página

- Figura 7 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 35 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X..... 70
- Figura 8 – Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 7 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado in ovo no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X 71

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução geral

O Brasil em relação à exportação de carne de frango, considerando produtos inteiros, cortes, processados e salgados, manteve ritmo positivo em volumes durante o ano de 2014. No período de janeiro à novembro, foram embarcadas 3,65 milhões de toneladas, resultado 2,4% superior ao acumulado nos onze primeiros meses de 2013. Já em receita, houve redução de 1%, segundo a mesma comparação, chegando a US\$ 7,27 bilhões (ABPA, 2014).

O crescimento na produção e exportação nas últimas duas décadas veio acompanhado do aumento da preocupação com a saúde dos plantéis, devido ao potencial apresentado pelos produtos avícolas de causarem toxi-infecções alimentares devido à contaminação dos mesmos por microrganismos como bactérias e vírus, com destaque para as salmoneloses e colibaciloses. Por isso, vários países exigem produtos com *Salmonella* zero em 25g (FDA, 2001).

O gênero *Salmonella* destaca-se como um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos, devido ao fato de estar amplamente distribuído na natureza, possuir um grande número de reservatórios, apresentar sorotipos inespecíficos quanto aos hospedeiros e apresentar cepas multiresistentes aos antimicrobianos (BERSOT, 2006).

Em reprodutoras, o controle das *Salmonellas* de interesse em saúde pública (*Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium) também da *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, é feito de acordo com as determinações da IN 78 (MAPA, 2009). Em frangos de corte o controle de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium é feito de acordo com o previsto no Ofício Circular N°. 1 de 2009 (MAPA, 2009).

O uso de probióticos tem sido uma ferramenta importante para o controle das *Salmonellas* de interesse em saúde pública devido à capacidade de exclusão competitiva e diminuindo a colonização intestinal por bactérias do gênero *Salmonella* sp (BERCHIERI & BARROW, 1998). A recomendação de uso precoce tem sido feita por diversos autores BERTECHINI & HOSSAIN (1993), pois as primeiras bactérias a chegarem ao trato gastrintestinal tenderão a colonizá-lo. MEDEIROS et al. (1998) demonstraram que probióticos são capazes de reduzir a colonização intestinal por bactérias do gênero *Salmonella* spp, e deste modo diminuir a incidência dessas

bactérias nas criações comerciais e ainda contribuir para minimizar os casos de infecção alimentar em humanos.

Em equilíbrio, o trato gastrintestinal consegue de forma mais eficiente absorver nutrientes e impedir a fixação e multiplicação de agentes patogênicos na mucosa intestinal prevenindo desta forma a instalação de doenças entéricas e consequentemente melhorando a produtividade, diminuindo a mortalidade e a contaminação dos produtos de origem animal (EDENS, 2003).

As vias mais comuns de aplicação de probióticos são por pulverização nos pintos no incubatório e na ração e água nos primeiros dias de vida na granja, podendo também ser aplicados em associação com prebióticos; e mais recentemente, as pesquisas vêm aprimorando a técnica de aplicação *in ovo*.

2. Revisão de literatura

2.1 Desenvolvimento do trato gastrointestinal no período final de incubação e pós-eclosão

As funções do sistema gastrointestinal do frango começam a se desenvolver quando o fluido amniótico é oralmente consumido por volta do 16º ao 17º dia de incubação (FERKET & UNI, 2006). A inoculação de nutrientes no líquido amniótico permite, portanto, a introdução de nutrientes específicos em contato com o enterócito antes da eclosão, direcionando sua diferenciação e melhorando a capacidade de digerir alimentos pelo pinto (VIEIRA, 2005). A nutrição *in ovo* também aumenta o nível de nutrientes disponível para o embrião, principalmente glicose, evitando a gliconeogênese de proteínas endógenas. Por outro lado, quando em altas concentrações, a solução nutritiva pode causar desequilíbrio osmótico, resultando na morte do embrião (CAMPOS et al., 2011).

Durante os últimos dias de incubação, o trato gastrointestinal é um dos órgãos que mais cresce de tamanho, passando de 1% do peso do embrião aos 18 dias de incubação para 3,5% no momento da eclosão. Segundo os autores, esse aumento do peso pode ser descrito pelo rápido desenvolvimento dos vilos na fase final de incubação, estando diretamente relacionado com a ingestão do líquido amniótico nos últimos dias de incubação (UNI et al., 2003a).

Após a eclosão, o trato gastrointestinal continua a se desenvolver rapidamente. Segundo DROR et al. (1977), os órgãos do aparelho digestivo de pintos de corte atingem o peso relativo máximo entre 3 e 8 dias de idade. Para vários autores (AKIBA & MURAKAMI, 1995; NOY & SKLAN, 1999), logo após a eclosão, o peso do intestino delgado aumenta mais rapidamente do que o peso corporal.

O desenvolvimento do intestino não é semelhante nos seus diferentes segmentos, sendo que o duodeno apresenta desenvolvimento mais precoce que o jejuno e o íleo (UNI et al., 1999). A mucosa intestinal apresenta desenvolvimento mais lento que o aumento do diâmetro intestinal até 14 dias de idade (NOY & SKLAN, 1997). Ao nascimento, os enterócitos e as vilosidades encontram-se mal desenvolvidos e poucas criptas são observadas. As criptas aumentam em número e tamanho e se proliferam rapidamente nos primeiros dias após o nascimento (GEYRA et al., 2001a).

Apesar de no momento da eclosão o pinto estar apto a consumir alimentos, seu trato intestinal ainda não está maduro e plenamente desenvolvido. A adaptação à

ingestão de alimentos depende do rápido desenvolvimento dos mecanismos de digestão e absorção, que por sua vez dependem diretamente do estímulo dado pela passagem de alimento no trato digestivo (VIEIRA & POPAL, 2000).

A maturidade da mucosa intestinal é representada pelo aumento na produção e atividade das enzimas digestivas, dos transportadores de membrana e pelo desenvolvimento dos enterócitos das criptas (NISTAN et al., 1991). Pesquisas mostraram que a maturidade intestinal pode ser influenciada por agentes tróficos, que estimulam o processo mitótico das células intestinais, e estão relacionados com a ingestão e digestão dos alimentos, bem como com as propriedades químicas dos nutrientes presentes no lúmen intestinal. O atraso no fornecimento de ração resultou em retardo no desenvolvimento da mucosa (UNI et al., 1998).

Estudos prévios mostraram que a alimentação imediatamente pós eclosão aumenta o desenvolvimento morfológico do intestino delgado (NOY & SKLAN, 1998), enquanto que o acesso atrasado prejudica o desenvolvimento da mucosa intestinal (GEYRA et al., 2001a; UNI et al., 1998; UNI et al., 2003b). Além disso, pintos não alimentados nas primeiras 48 horas após a eclosão apresentaram menor comprimento de vilos (YAMAUCHI et al., 1996) e menor tamanho de cripta (GEYRA et al., 2001b).

2.2 *Salmonella* spp.

Salmonella é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo e não formador de esporos, que se comporta como patógeno intracelular facultativo e devido diferenças bioquímicas subdividem-se em 2 espécies: *Salmonella* Bongori e *Salmonella* Enterica sendo que a última divide-se em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A doença causada por *Salmonella* é genericamente chamada de salmonelose (BACK & ISHIZUKA, 2010). A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis e a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Thyphimurium são os principais sorotipos encontrados em aves que estão relacionados com salmoneloses em humanos (BORSOI et al., 2011). As aves são os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. existentes. As *Salmonellas* são frequentemente relatadas em aves e seus subprodutos, particularmente devido ao sistema de produção em confinamento ao qual são submetidas e aos programas nacionais para isolamento e identificação de *Salmonella* spp. (SU et al., 2011).

O ceco é conhecido como reservatório de *Salmonella*, porém o íleo tem interesse particular por sua proximidade ao ceco, albergando grande população

microbiota e também como porção do intestino frequentemente colonizada por *Salmonella* (THOMPSON & APPLGATE 2006). DESMIDT et al. (1998) analisaram a localização de *Salmonella* no ceco de frangos, utilizando a técnica de imunistoquímica e observaram que as *Salmonellas* estavam presente em grande número nas criptas, porém não aderidas às células epiteliais e que a invasão intestinal ocorreu no ápice da vilosidade. Relatam ainda, que a ligação da *Salmonella* nas vilosidades é feita em receptores específicos que estão presentes em enterócitos maduros, mas não em enterócitos não diferenciados.

2.3 Probióticos

Na União Européia, desde 2006, não é permitido o uso de qualquer antimicrobiano promotor de crescimento na produção animal, sendo permitido o uso de antibióticos e quimioterápicos somente com finalidade terapêutica. Desde então, diversas alternativas naturais aos antimicrobianos têm sido estudadas, como probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, entre outros.

Probióticos foram definidos por FULLER (1989), como sendo um suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos, que no organismo animal atuam de forma benéfica melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal sendo utilizados na prevenção e tratamento de distúrbios gastrointestinais, como promotores de crescimento e como imunostimulantes.

Segundo, SILVA & NÖRNBERG (2003) e SANTOS & TURNES (2005) o uso de probióticos e prebióticos podem proporcionar as aves modulação benéfica da microbiota intestinal, melhora na resposta imune, integridade intestinal e conseqüentemente no desempenho. Alguns pesquisadores demonstraram que as aves são alojados em aviários apenas 8 horas após a eclosão (BAIÃO & CANÇADO, 1998), sendo que durante este período os mesmos são tratados de forma intensiva, criando oportunidades para a colonização com microrganismos indesejáveis (EDENS et al., 1997). A fim de promover o início da colonização intestinal, tem sido proposto que os pintinhos recebam probiótico já no incubatório, antes de ir para o campo. São descritos vários métodos de administração da microbiota intestinal, ou seja, por meio de pulverização sobre as aves, inoculação em ovos embrionados, inoculação via cloaca, reutilização de cama, inoculação via endoesofágica e adição via ração ou água de bebida. O inóculo pode ser obtido através de fezes ou de conteúdo cecal recém-

colhidos (ANDREATTI FILHO et al., 1997, 1999 e 2000 e ANDREATTI FILHO & SILVA 2005).

Uma forma atraente para administrar probióticos pode ser *in ovo*, utilizando como veículo vacinas, pois várias delas utilizam a tecnologia *in ovo* e são aplicados no 18^o dia de incubação (DING et al., 2005). As informações sobre a aplicação de probiótico *in ovo* são escassas e ainda não existe um consenso de que os probióticos têm de ser administrados o mais cedo possível.

Embora vários estudos tenham sugerido que o trato digestório dos pintos recém-nascidos é estéril (VAN DER WIELEN et al., 2002, AMIT-ROMACH et al., 2004), existem indicações que as bactérias podem se estabelecer no intestino quando o trato gastrointestinal esta em desenvolvimento no embrião, e quando começa a ingestão do líquido amniótico (KLASING, 1998). Microrganismos presentes na gema podem também ser ingeridos no 18^o dia de incubação, durante a absorção do saco vitelino (DEEMING, 2005). Portanto, os probióticos poderiam, teoricamente, ser administrados em ovos embrionados, e se estabelecer como microbiota intestinal do embrião.

Pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico, seguido por desafio de *Salmonella* após o nascimento, tiveram desempenho semelhante depois de 21 dias em comparação com o controle não desafiado. Os pintainhos que não receberam probiótico *in ovo*, e foram desafiados após a eclosão tiveram diminuição do desempenho (LEANDRO et al., 2010). Os probióticos podem ser eficazes como promotores de crescimento em frangos de corte, mas é necessário um melhor entendimento sobre o papel da microbiota na maturação do embrião de frangos de corte em desenvolvimento. Ferramentas moleculares têm contribuído enormemente para compreensão da dinâmica de colonização microbiana no desenvolvimento do intestino das aves. Novas abordagens nas técnicas de identificação da microbiota do trato gastrointestinal de frangos de corte aplicadas aos probióticos podem resultar em compreensão mais abrangente da ecologia microbiana intestinal.

A ação dos probióticos ocorre pela exclusão competitiva, ou seja, competição por sítios de ligação e nutrientes (WATKINS & MILLER, 1983), produção de substâncias antibacterianas, por estímulo da imunidade (INOOKA et al., 1986) e por uma maior produção de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta, os quais tem propriedades bacteriostáticas e bactericidas (FULLER, 1977).

A exclusão competitiva ocorre quando as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas

e por competição por nutrientes, resultando em exclusão das bactérias patogênicas por competição de espaço e alimento. Já o estímulo da imunidade ocorre devido ao aumento da atividade de macrófagos e do aumento dos níveis de anticorpos (PERDIGON et al., 1993). Os probióticos também podem afetar os patógenos através da síntese de bacteriocinas, de ácidos orgânicos voláteis, peróxido de hidrogênio, ou atuar sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (OUWEHND et al., 1999).

As cepas bacterianas utilizadas no preparo de probióticos são principalmente: *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* sp, *Enterococcus faecium* e *Bacillus* spp. (SIMON et al., 2001). Contudo, ainda não é conhecida a composição microbiana ideal de um produto probiótico. Sabe-se, até o presente momento, que ela deve ser múltipla, espécie específica e os microrganismos de sua composição devem sofrer poucas passagens em meios artificiais de cultivo. Aparentemente, um maior número de espécies bacterianas determina um probiótico mais efetivo (ANDREATTI FILHO & SILVA, 2005).

Diante do exposto o capítulo 2, denominado “**EFEITO DE DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na *British Poultry Science*, tendo como objetivo avaliar o desempenho zootécnico e a biometria entérica nas diferentes fases de criação, de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico.

O capítulo 3, denominado “**HISTOMORFOMETRIA E ULTRAESTRUTURA DA MUCOSA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO E DESAFIADOS COM *SALMONELLA* Enteritidis**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na *Journal of Animal Science*, tendo como objetivo avaliar a integridade da mucosa entérica de frangos de corte utilizando a microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura nas diferentes fases de criação, submetidos a diferentes vias de aplicação de probióticos e desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis, bem como avaliar o efeito da administração de probiótico sobre o controle de *Salmonella* em frangos de corte.

3. Referências

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 20014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> Acesso em 10 Jan. 2015.

AKIBA, Y.; MURAKAMI, H. Partitioning of energy and protein during early growth of broiler chicks and contribution of vitteline residue. In: PROCEEDINGS OF THE WORLD POULTRY SCIENCE CONFERENCE, 1995. Antalia, Turkey. **Anais...** p.42-52, 1995.

AMIT-ROMACH E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Environment, health, and behavior microflora ecology of the chicken intestine using 16s ribosomal dna primers. The Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, Hebrew University of Jerusalem, **Poultry Science** v.83, p.1093–1098, 2004.

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, cap.15, p.225-248, 2005.

ANDREATTI FILHO, R.L.; MESTRINEL JR, P.; SAMPAIO, H.M.; CROCCI, A.J. Efeito da vacina contra coccidiose sobre a colonização de *Salmonella enteritidis* em aves inoculadas com microbiota cecal anaeróbica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.311-316, 1999.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbica no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.661-672, 1997.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; RIBEIRO, A.R.; KONDO, N.; CURI, P.R. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.107-112, 2000.

- BACK, A. & ISHIZUKA, M.M. Micoplasmose aviária. In:_____. Principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde animal; 2010; São Paulo, SP; Fundação Cargill; 2010. p. 190-238.
- BAIÃO, N.C. & CANÇADO, S.V. Efeito do intervalo entre o nascimento e o alojamento de pintos sobre o desempenho dos frangos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, p.191-194, 1998.
- BERCHIERI, A.; BARROW, P.A. O desenvolvimento da microbiota intestinal em pintos de corte: prós e contras. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. Simpósio Internacional sobre manejo de pintos de corte. 1998, Santos. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.183-190, 1998.
- BERSOT, L.S. *Salmonella* no Brasil: sua importância no abate de aves. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- BERTEQUINI, A.G.; HOSSAN, S.M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de conter In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1993, Santos. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.1, 1993.
- BORSOI, A.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following Broiler Chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 266-273. 2011.
- CAMPOS, A.M.A.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; SILVA, E.A.; ALBINO, L.F.T.; NOGUEIRA, E.T. Efeito de inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.8, p.1712-1717, 2011.

- FDEEMING, D.C. Yolk sac, body dimensions and hatchling quality of ducklings, chicks and poults. **British Poultry Science**, v.46, p.560-564, 2005.
- DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, p.259-269, 1998.
- DING, X.; LILLEHOJ, H.S.; DALLOUL, R.A.; MIN, W.; SATO, T.; YASUDA, A.; LILLEHOJ, E.P. In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. **Vaccine**. v.23(28), p.3733-3740, 2005.
- DROR, Y.; NIR, I.; NITSAN, Z. The relative growth of internal organs in light and heavy breeds. **British Poultry Science**, v.18, p.493-496, 1977.
- EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.2, p.75-97, 2003.
- EDENS, F.W.; PARKHURST, C.R.; CASAS, I.A.; DOBROGOSZ, W.J. Principles of *ex ovo* competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poultry Science**, v.76, p.179-196, 1997.
- FDA. U. S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online, disponível no site <<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>>, Chapter 21A, revisão de janeiro de 2001.
- FERKET, P. & UNI, Z. Early feeding – *in ovo* feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE 12th, Verona. **Anais...** European Poultry Conference, 2006 (CD-ROM).
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology** v.6, p.365-378,1989.
- FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. **British Poultry Science**, v.1, p.85-94, 1977.

- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v.80, p.776-782, 2001a.
- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. **British Journal of Nutrition**, v.86, p.53-61, 2001b.
- INOOKA, S.; UEHARA, S.; KIMURA, M. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. **Poultry Science**, v.65, p.1217-1219, 1986.
- KLASING, K.C. Digestion of Food. In: Comparative Avian Nutrition. Cab International, Wallingford, p. 36–70, 1998.
- LEANDRO, N.S.M.; OLIVEIRA, A.S.C.; GONZALES, E.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H.; ANDRADE, M.A. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados. Desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1509-1516, 2010.
- MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. – Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2009.
- MEDEIROS, A.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; JUNQUEIRA, O.M.; PAULILLO, A.C.; RONCHI, C.P.H. Avaliação da proteção conferida por estirpes de *Lactobacillus* sp. a frangos de corte infectados por *Salmonella*. In: Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas – trabalhos concorrentes ao prêmio de pesquisa avícola José Maria Lamas da Silva, 1998, Campinas. **Anais...Campinas: FACTA**, p.57, 1998.
- NISTAN, Z.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. **Poultry Science**, v.70, n.10, p.2040-2048, 1991.

- NOY, Y. & SKLAN, D. Energy utilisation in newly hatched chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1750 - 1756, 1999.
- NOY, Y. & SKLAN, D. Posthatch development in poultry. **Journal Applied Poultry Research**, v.6, p.344-354, 1997.
- NOY, Y. & SKLAN, D. Yolk utilisation in the newly hatched poult. **British Poultry Science**, v.39, p.446-451, 1998.
- OUWEHAND, A.C.; KIRKAVAINEN, P.V.; SHORTT, C.; SALMENEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v.9, p.43-52, 1999.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; MEDICI, M.; HOLGADO, A.A.P.R. Influence of the use of *Lactobacillus casei* as an oral adjuvant on the levels of secretory immunoglobulin A during an infection with *Salmonella typhimurium*. **Food Agriculture Immunologic**, v.5, p.27-37, 1993.
- SANTOS, J.R.G. & TURNES, C.G. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.741-747, 2005.
- SILVA, L.P. & NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.983-990, 2003.
- SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, E. Probiotic feed additives: effectiveness and expected modes of action. **Journal of Animal Feed Science**, v.10, p.51-67, 2001.
- SU, Y.C.; YU, C.Y.; LIN, J.L.; LAI, J.M.; CHEN, S.W.; TU, P.C.; CHU, C. Emergence of *Salmonella enteric* Serovar Potsdam as a Major Serovar in Waterfowl Hatcheries and chicken eggs. **Avian diseases**, v. 55(2), p. 217 -222, 2011.
- THOMPSON, K.L. & APPLGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broiler. **Poultry Science**, v.85, p.535-1540. 2006.

- UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v.77, p.75-82, 1998.
- UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Post-hatch development of small intestinal function in the poult. **Poultry Science**, v.78, p.215-222, 1999.
- UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, n.2, p.320-327, 2003b.
- UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late -term embryo. **Poultry Science**, v.82, p.1747-1754, 2003a.
- VAN DER WIELEN, P.W.J.J.; KEUZENKAMP, D.A.; LIPMAN, L.J.A.; VAN KNAPEN, F.; BIESTERVELD, S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. **Microbial Ecology**, v.44, p.286-293, 2002.
- VIEIRA, S. L. Nutrição do embrião. **Ave World**, v.18, n.3, p.66-71, 2005.
- VIEIRA, S.L. & POPHAL, S. Nutrição pós-eclosão de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.3, p.189-199, 2000.
- WATKINS, B.A. & MILLER, B.F. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. **Poultry Science**, v.61, p.1772-1779, 1983.
- YAMAUCHI, K.E.; KAMISOYAMA, H.; ISSHIKI, Y. Effects of fasting and refeeding on structure of the intestinal villi and epithelial cells in white leghorn hens. **British Poultry Science**, v.37, p.909-921, 1996.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

EFEITO DE DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

Resumo – Com o objetivo de avaliar o desempenho zootécnico, a biometria entérica e o rendimento de carcaça e cortes comerciais de frangos de corte, um experimento foi realizado com 720 pintos machos, de um dia de idade da linhagem Cobb®, com densidade populacional de 12 aves/m². O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 8 repetições de 30 aves cada. Os tratamentos foram: T1 (controle): pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek; T2: pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico no 18º dia de incubação utilizando como diluente a vacina de Marek; T3: pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek e pulverizados ao nascimento com solução contendo probiótico. Foi avaliado o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade aos 7, 21, 35 e 42 dias de idade; e índice de eficiência produtiva ao final do período de criação. As análises de biometria entérica foram realizadas ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade, sendo utilizado 15 aves por tratamento, totalizando 45 aves por abate. Aos 42 dias de idade para as análises de rendimento de carcaça foram coletadas, ao acaso, 25 aves por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. A conversão alimentar na fase pré-inicial de criação, apresentou diferença; sendo que as aves submetidas à inoculação de probiótico *in ovo* apresentaram melhor conversão alimentar quando comparado com as aves que receberam probiótico pulverizado via spray, mas sem diferirem do tratamento controle. Aos 21 dias de idade observou-se diferença no comprimento do segmento de jejuno, sendo os maiores comprimentos encontrados no tratamento *in ovo*, porém sem diferir do tratamento pulverizado via spray. O uso de probiótico não influenciou o rendimento de carcaça e cortes comerciais. Assim, a utilização de probióticos apresentou melhor conversão alimentar para as aves submetidas à inoculação de probiótico *in ovo* na primeira semana pós-eclosão, e atuou na biometria entérica aos 21 dias de idade.

Palavras-chave: aditivos alternativos, aves, exclusão competitiva, nutrição *in ovo*, trato gastrointestinal.

EFFECTS OF DIFFERENT ROUTES OF ADMINISTRATION OF PROBIOTICS ON BROILER PERFORMANCE

Abstract - A trial was conducted to evaluate broiler performance, intestinal biometric parameters, carcass and commercial cuts yield. Day-old male Cobb® chicks (720; stocking density 12 birds/m²) were allotted to one of three treatments (T1, T2 and T3; eight replications per treatment; 30 birds per pen) in a completely randomized design. Chicks were vaccinated *in ovo* against Marek's disease on day 18 of incubation (T1, control), inoculated *in ovo* with probiotics diluted in Marek's disease vaccine on day 18 of incubation (T2), or vaccinated *in ovo* against Marek's disease on day 18 of incubation and sprayed with probiotic solution at hatching (T3). Weight gain, feed intake, feed conversion rate (FCR) and livability were evaluated at 7, 21, 35 and 42 days of age; production efficiency factor was determined at the end of the rearing period. Intestinal biometric analysis (15 birds per treatment; 45 birds per slaughter) was performed at hatching and at 7, 21, 35 and 42 days of age; 42 day-old birds (25 birds per treatment) were randomly selected for carcass yield determination. Data were analyzed using analysis of variance and means compared using the Tukey test at a 5% significance level. In the pre-starter phase, birds submitted to T2 had significantly higher FCR than birds submitted to T3, but similar FCR to birds submitted to T1 (control). At 21 days of age, birds submitted to T2 or T3 had significantly longer jejunal segments than birds submitted to T1 (control). Probiotic inoculation *in ovo* improved feed conversion rates in the first week of life and affected intestinal biometric parameters at 21 days of age. Probiotic treatment had no impact on carcass or commercial cuts yield.

Keywords: alternative feed additives, broilers, competitive exclusion, gastrointestinal tract, *in ovo* nutrition.

Introdução

A indústria avícola atual vem buscando cada vez mais alternativas que reduzam os custos de produção e melhorem a qualidade final do produto a fim de atingir expectativas do consumidor, cada vez mais preocupado com a sua segurança alimentar. Assim, preservar a integridade intestinal dos frangos de corte é cuidar literalmente do sucesso desse agronegócio, pois além da genética avançada melhorando constantemente essas aves, dos rigores da biosseguridade preservando sua sanidade e da alta tecnologia de ambiência garantindo a zona de conforto, a nutrição fornece as demais ferramentas para o melhor desempenho pecuário do mundo, começando em multiplicar por cinco seu peso desde o alojamento até chegar aos sete dias de vida (BENEVIDES, 2014). O Brasil em relação à exportação de carne de frango, considerando produtos inteiros, cortes, processados e salgados, manteve ritmo positivo em volumes durante o ano de 2014. No período de janeiro à novembro, foram embarcadas 3,65 milhões de toneladas, resultado 2,4% superior ao acumulado nos onze primeiros meses de 2013. Já em receita, houve redução de 1%, segundo a mesma comparação, chegando a US\$ 7,27 bilhões (ABPA, 2014).

O trato gastrointestinal quando em equilíbrio, consegue de forma mais eficiente absorver nutrientes e impedir a fixação e multiplicação de agentes patogênicos na mucosa intestinal prevenindo desta forma a instalação de doenças entéricas e conseqüentemente melhorando a produtividade, diminuindo a mortalidade e a contaminação dos produtos de origem animal (EDENS, 2003; RAMOS et al., 2011). Nesse sentido, o uso de probióticos em frangos de corte vem atraindo a atenção de pesquisadores, uma vez que os mesmo atuam benéficamente no trato gastrointestinal dos hospedeiros, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal, estimulando a maturidade da mucosa entérica além de estímulos imunomoduladores. Dentro deste contexto os probióticos destacam-se como aditivos alternativos ao uso de antibióticos uma vez que os mesmo são causadores de resistência em humanos (NUNES et al., 2009; DOMINGUES et al., 2014).

A ação dos probióticos ocorre pela exclusão competitiva, ou seja, competição por sítios de ligação e nutrientes (WATKINS & MILLER, 1983), produção de substâncias antibacterianas, por estímulo da imunidade (INOOKA et al., 1986), por maior produção de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta, os quais tem propriedades bacteriostáticas e bactericidas (FULLER, 1977; NUNES et al., 2009). A exclusão competitiva ocorre quando as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação

na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas e por competição por nutrientes e espaço, resultando em exclusão das bactérias patogênicas. Já o estímulo da imunidade ocorre devido ao aumento da atividade de macrófagos e do aumento dos níveis de anticorpos (PERDIGON et al., 1993).

São descritos vários métodos de administração da microbiota intestinal, ou seja, por meio de pulverização sobre as aves, inoculação em ovos embrionados, inoculação via cloaca, reutilização de cama, inoculação via endoesofágica e adição via ração ou água de bebida. O inóculo pode ser obtido através de fezes ou de conteúdo cecal recém-colhidos (ANDREATTI FILHO et al., 1997, 1999 e 2000; ANDREATTI FILHO & SILVA, 2005).

Uma forma atraente para administrar probióticos pode ser *in ovo*, utilizando como veículo vacinas, pois muitas delas utilizam a tecnologia *in ovo* e são aplicados no 18º dia de incubação (DING et al., 2005). Mas as informações sobre a aplicação de probiótico *in ovo* são escassas e ainda não existe um consenso de que os probióticos têm de ser administrados o mais cedo possível.

O processo de maturação da mucosa intestinal em fases iniciais de criação pode afetar de forma significativa o desempenho zootécnico das aves uma vez que a mucosa entérica possui importante papel na fisiologia animal, com a função de realizar a digestão e absorção de nutrientes (MAIORKA et al., 2000), Dentro deste contexto, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar o desempenho zootécnico de frangos de corte, utilizando probióticos em várias concentrações e com diferentes vias de administração (CRUZ et al., 2003; APPELT et al., 2010; LEANDRO et al., 2010; SANTOS et al., 2010; RIGOBELLO et al., 2011; CAMPOS et al., 2011).

Alguns nutrientes adicionados às dietas estão diretamente relacionados com a integridade da mucosa, influenciando na fisiologia digestiva das aves. Assim, substâncias que tenham ação trófica sobre o intestino poderão propiciar melhor desempenho das aves pela maior capacidade de digerir e absorver os nutrientes da dieta. Na literatura são escassos os trabalhos utilizando probióticos visando estudar a biometria entérica de frangos de corte. Assim, BORATTO et al. (2004) em estudo realizado com uso de probiótico em aves com inoculação da *Escherichia coli* encontraram aumento no peso do intestino. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico, biometria intestinal e rendimento de carcaça de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicações de probiótico.

Material e Métodos

Um experimento foi realizado em incubatório de empresa matrizeira do Estado de São Paulo, com ovos oriundos de matrizes Cobb® com 39 semanas (Figura 1). No 18º dia de incubação, no momento da transferência, os ovos com peso médio de 64 g foram selecionados após a realização da ovoscopia e colocados em bandejas de nascimento com capacidade de 96 ovos cada. A seguir, os mesmos foram vacinados contra a doença de Marek com vacina aplicada *in ovo* no 18º dia de incubação por meio de injetora comercial (Figura 2).



Figura 1 – Ovos oriundos de matrizes Cobb® com 39 semanas, marcados com cores diferentes de acordo com os tratamentos utilizados, (vermelho) T1 (controle): pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek; (verde) T2: pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico no 18º dia de incubação utilizando como diluente a vacina de Marek; (roxo) T3: pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek e pulverizados ao nascimento com solução contendo probiótico comercial (o mesmo utilizado para a inoculação *in ovo*).



Figura 2 – Transferência dos ovos no 18º dia de incubação. Em (A) e (B) preparação da vacina de Marek; (C) ovoscopia; (D) acoplamento da vacina na máquina injetora; (E) teste da injetora; (F) máquina injetora; (G) ovos introduzidos na máquina injetora; (H) momento da inoculação dos ovos; (I) ovos já vacinados transferidos para caixa de nascimento.

Posteriormente as aves foram alojadas no aviário experimental da FMVZ-UNESP/Botucatu, sendo utilizados 720 pintos de um dia de idade, machos da linhagem Cobb®, para as análises de desempenho zootécnico, biometria entérica e rendimento de carcaça. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 8 repetições de 30 aves cada. Os tratamentos foram: T1 (controle): pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek; T2: pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico no 18º dia de incubação utilizando como diluente a vacina de Marek; T3: pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek e pulverizados ao nascimento com solução contendo probiótico (o mesmo utilizado para a inoculação *in ovo*). O objetivo do T3 foi testar a via de aplicação do probiótico (Figura 3). O probiótico utilizado foi um produto comercial que possui em sua composição flora definida com 21 cepas (*Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus delbrueckii*; *Lactobacillus plantarum* (3 cepas); *Lactobacillus reuteri* (5 cepas); *Lactobacillus salivarius*; *Pediococcus acidilactici* (3 cepas); *Enterococcus faecium* (6 cepas); *Bacillus subtilis*, sendo inoculado 0,05ml/ovo.

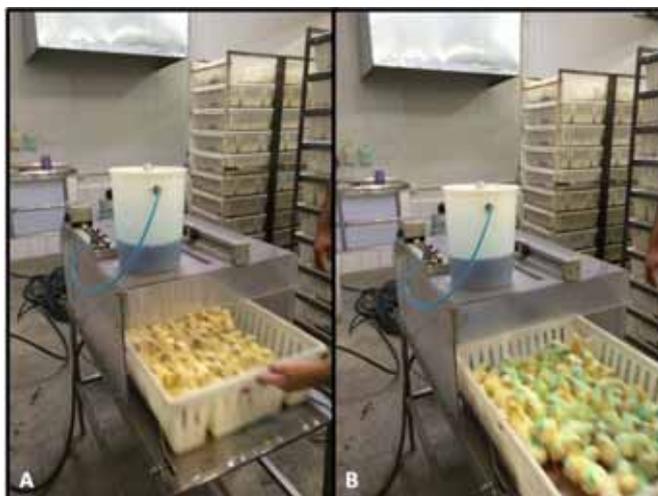


Figura 3 – Em (A) aves selecionadas e sexadas após o nascimento recebendo solução contendo probiótico pulverizado via spray; (B) aves saindo da máquina pulverizadora.

O aviário experimental possui 40m de comprimento por 8m de largura, e pé direito de 3,50m sendo subdividido em 48 boxes. Na ocasião deste trabalho o tamanho dos boxes foi adequado para a densidade de 12 aves por m^2 . Cada boxe foi equipado com um comedouro tubular com capacidade para 20 kg de ração e um bebedouro pendular. O aviário experimental é dotado de ventiladores distribuídos de forma a promover ventilação homogênea em todos os boxes.

O sistema de manejo adotado foi o tradicionalmente utilizado nas criações comerciais de frangos de corte. Durante a primeira semana de idade foram utilizados bebedouros do tipo pendular e comedouros tubulares infantis. A partir da segunda semana, foram utilizados bebedouros pendulares e comedouros tubulares. O aquecimento inicial foi feito por meio de campânulas elétricas providas de lâmpadas infravermelhas de 250W até o final da segunda semana, uma em cada boxe. A iluminação artificial do galpão foi fornecida de forma a completar 23 horas de luz durante a primeira semana, 22 horas de luz na segunda e terceira semanas e 20 horas de luz a partir da quarta semana de criação, utilizando-se lâmpadas de 40W, de forma a se obter 22 lumens/ m^2 (Figura 4).

A cama utilizada foi de maravalha nova. Os dados de temperatura e umidade máxima e mínima foram registrados diariamente, utilizando-se um termo-higrômetro de máxima e mínima (Figura 5 e 6). As rações experimentais foram produzidas na Fábrica de Rações Experimentais da FMVZ/UNESP. O arraçoamento foi dividido em

quatro fases: pré-inicial (1-7 dias), inicial (8-21 dias), crescimento (22-35 dias) e final (36-42 dias), seguindo as recomendações de composição e exigências nutricionais das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos de ROSTAGNO et al. (2011). As aves receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental (Tabela 1).

O experimento foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (protocolo 99/2013 – CEUA), determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus Botucatu.



Figura 4 – Aviário experimental da FMVZ/UNESP Campus de Botucatu: Em (A) corredor central; (B) boxe padrão do aviário; (C) boxe equipado com comedouro e bebedouro pendular e ventilador e (D) boxe com comedouro infantil e campânula elétrica de aquecimento.

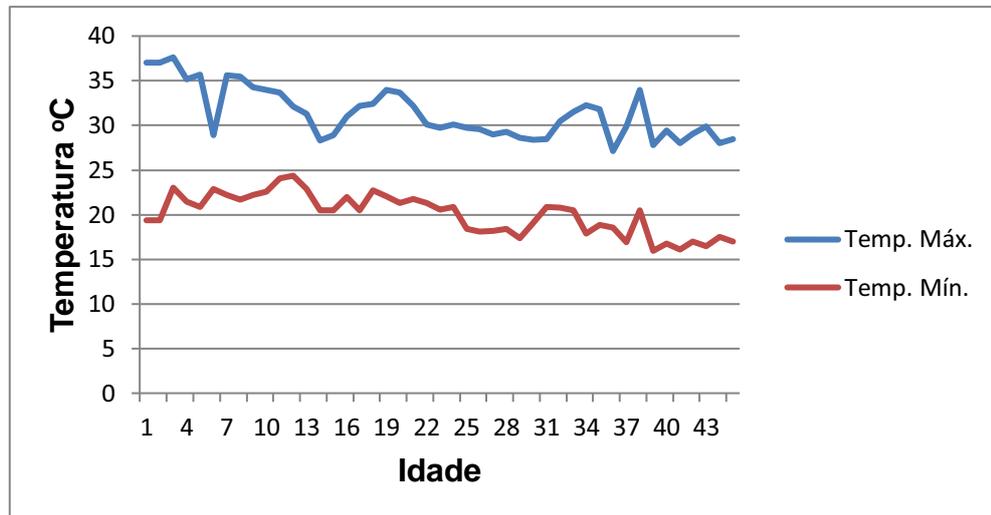


Figura 5 - Controle de temperatura ambiente registrada diariamente durante o período experimental.

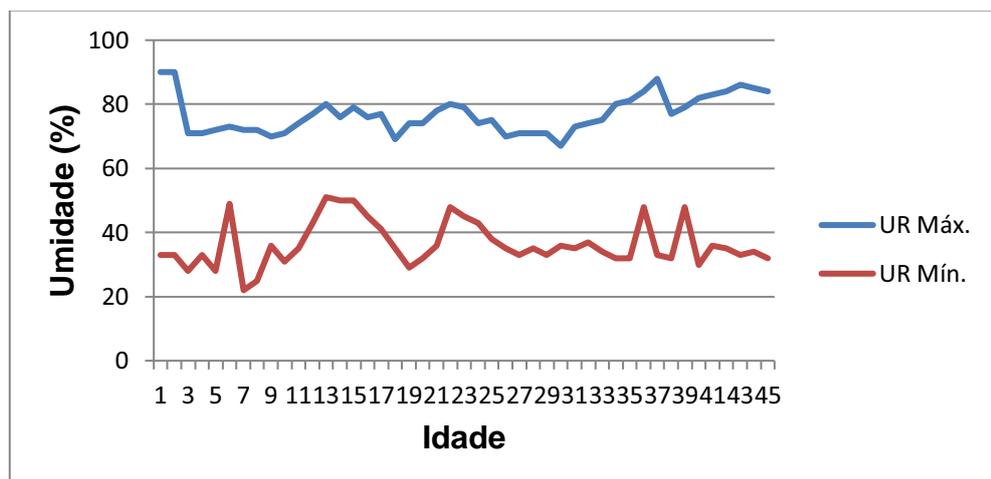


Figura 6 - Controle da umidade do ar registrada diariamente durante o período experimental.

Tabela 1 – Composições centesimais e nutricionais calculadas das rações basais.

INGREDIENTES	Fases			
	Pré-Inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)	Crescimento (22 a 35 dias)	Final (36 a 42 dias)
Milho moído	55,604	59,003	61,399	65,413
Óleo de soja	1,900	2,200	3,200	3,300
Farelo de soja (45%)	38,360	34,900	31,600	27,630
Sal refinado	0,490	0,470	0,440	0,430
Calcário calcítico	0,807	0,824	0,854	0,885
Fosfato bicálcico	1,900	1,850	1,800	1,700
Cloreto de colina (60%)	0,060	0,060	0,050	0,050
DL - Metionina	0,352	0,282	0,253	0,238
L - Lisina HCl	0,276	0,209	0,186	0,222
L-Treonina	0,101	0,057	0,038	0,047
Suplemento vitamínico ¹	0,050	0,045	0,035	0,035
Suplemento mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050
Anticoccidiano ³	0,050	0,050	0,050	-
TOTAL (kg)	100,000	100,000	100,000	100,000
Composição nutricional calculada				
NUTRIENTES	Valores			
Proteína bruta (%)	22,200	20,799	19,494	17,999
Energia met.ap. ⁴ (kcal/kg)	2950	3007	3104	3158
Sódio (Na) (%)	0,219	0,210	0,198	0,193
Cálcio (%)	0,953	0,937	0,927	0,901
Fósforo útil (%)	0,452	0,438	0,424	0,400
Lisina digestível (%)	1,310	1,174	1,078	1,010
Metionina digestível (%)	0,643	0,560	0,517	0,486
Met.+Cist ⁵ digestível (%)	0,943	0,845	0,787	0,737
Triptofano digestível (%)	0,250	0,232	0,214	0,193
Treonina digestível (%)	0,851	0,763	0,701	0,656

¹Suplemento vitamínico: PX VIT FC 0,5 kg/ton (VACCINAR®) níveis de garantia por kg de ração para a fase pré-inicial: ácido fólico 0,8 mg; ácido pantotênico 14,5 mg; BHT 2,5 mg; biotina 0,03 mg; niacina 43,5 mg; vit. A 10000 UI; vit. B1 1,5 mg; vit. B12 14µg; vit. B2 6 mg; vit. B6 3 mg; vit. D3 2500 UI; vit. E 20,25 UI; vit. K3 2,4 mg. PX VIT FC 0,45 kg/ton (VACCINAR®) níveis de garantia por kg de ração para a fase inicial: ácido fólico 0,72 mg; ácido pantotênico 13,05 mg; BHT 2,25 mg; biotina 0,027 mg; niacina 39,15 mg; vit. A 9000 UI; vit. B1 1,35 mg; vit. B12 12,6 µg; vit. B2 5,4 mg; vit. B6 2,7 mg; vit. D3 2250 UI; vit. E 18,22 UI; vit. K3 2,16 mg. PX VIT FC 0,35 kg/ton (VACCINAR®) níveis de garantia por kg de ração para a fases de crescimento e final: ácido fólico 0,56 mg; ácido pantotênico 10,15 mg; BHT 1,75 mg; biotina 0,021 mg; niacina 30,45 mg; vit. A 7000 UI; vit. B1 1,05 mg; vit. B12 9,8 µg; vit. B2 4,2 mg; vit. B6 2,1 mg; vit. D3 1750 UI; vit. E 14,17 UI; vit. K3 1,68 mg. ²Suplemento mineral: PX MINERAL FC 0,5 kg/ton (VACCINAR®) níveis de garantia por kg de ração: cobre 10 mg; ferro 48 mg; iodo 0,7 mg; manganês 78 mg; selênio 0,25 mg; zinco 55 mg. ³Coxistac 12%; Energia met. ap.= Energia metabolizável aparente; ⁵Met + Cist= Metionina + Cistina.

1. Desempenho

Para a avaliação do desempenho (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, viabilidade e índice de eficiência produtiva), foram registradas as quantidades de ração consumida e realizadas as pesagens dos animais no início e no final de cada fase. As mortalidades foram registradas diariamente para determinação do consumo real das aves. O consumo de ração foi calculado pela diferença de pesos entre a quantidade fornecida e as sobras existentes no final de cada fase, dividido pelo número de aves existentes em cada tratamento. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre a pesagem inicial e final de cada fase, dividido pelo número de aves de cada tratamento. A conversão alimentar foi obtida pela relação entre o consumo de ração das aves e seu ganho de peso em cada fase e corrigido pelo peso das aves mortas no período. A mortalidade foi calculada pela relação entre o número de aves que morreram em cada fase e o número inicial, multiplicado por 100. O índice de eficiência produtiva (IEP) também foi calculado aplicando-se a fórmula: ganho de peso diário (g) x viabilidade (%) / conversão alimentar x 10.

2. Biometria entérica

As análises de biometria entérica foram realizadas ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade, sendo utilizadas 15 aves por tratamento, totalizando 45 aves por abate, que após jejum de 6 horas, foram transportadas para o abatedouro experimental da FMVZ/UNESP-Botucatu. Estas foram pesadas individualmente, insensibilizadas por eletronarcole e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida, das quais foi retirado o trato gastrointestinal e em seguida, efetuadas pesagens do intestino completo e posteriormente de seus segmentos: duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon, em balança semi-analítica. A avaliação do comprimento dos segmentos intestinais foi realizada com o auxílio de uma fita métrica.

3. Rendimento de carcaça e cortes comerciais

Para as análises de rendimento de carcaça, aos 42 dias de idade foi realizado o abate, onde foram coletadas, ao acaso, 25 aves por tratamento, as quais foram identificadas e submetidas ao jejum de 6 horas, posteriormente foram transportadas para o abatedouro experimental da FMVZ/UNESP-Botucatu, pesadas para obtenção do peso vivo, insensibilizadas por eletronarcolese e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida. Após o abate, foram pesadas as carcaças sem cabeça, pés e vísceras, e em seguida foram subdivididas em asas, peito, dorso e coxas e sobrecoxas e os cortes foram pesados separadamente. O rendimento de carcaça foi calculado em relação ao peso vivo antes do abate [%RC = (peso carcaça*100/peso vivo)]. E o rendimento das partes da carcaça e peito, em função do peso da carcaça: [%RP = (peso da parte*100/peso carcaça)].

4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional Statistical Analysis System (2009). As diferenças entre as médias foram submetidas ao teste *Tukey*, utilizando o procedimento GLM (*General Linear Models*) ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

1. Desempenho

Os resultados das características de desempenho zootécnico nas diferentes fases de criação estão apresentados na Tabela 2.

Para o período de 1 a 7 dias de idade, observou-se que o peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo de ração e viabilidade não foram influenciados pelos tratamentos ($p > 0,05$), enquanto a conversão alimentar apresentou diferença ($p < 0,05$), sendo que as aves submetidas à inoculação de probiótico *in ovo* apresentaram melhor conversão alimentar quando comparado com as aves que receberam probiótico pulverizado via spray ao nascimento, porém sem diferirem do tratamento controle. Resultados divergentes ao presente estudo foram encontrados por CAMPOS et al. (2011) em trabalho com inoculação de soluções nutritivas *in ovo* sobre eclodibilidade e desempenho de frangos de corte, não verificaram influência dos tratamentos na conversão alimentar e por APPELT et al. (2010) ao estudar diferentes níveis de probióticos em rações de origem animal e vegetal no mesmo período de criação para frangos de corte, não observaram influência dos tratamentos nas variáveis de desempenho.

Em estudos realizados com probióticos na ração ou inoculados em ovos embrionários, LEANDRO et al. (2010) demonstraram que na fase pré-inicial a inoculação do probiótico não influenciou o peso ao primeiro dia de vida e nem o ganho de peso no período de 1 a 10 dias de idade, demonstrando que a inoculação via ovo do probiótico aos 16 dias de incubação, não prejudicou o desenvolvimento embrionário e o desempenho inicial de pintos de corte. No entanto, a conversão alimentar do grupo inoculado com probiótico foi pior quando comparada à das aves controle. Por outro lado, em estudos utilizando probiótico, CRUZ et al. (2003) verificaram que o peso das aves ao nascimento foi menor quando os embriões foram suplementados com probiótico. É sabido que na primeira semana de vida das aves, a capacidade do trato digestório pode ser considerada um fator limitante para o consumo de alimento, digestão e absorção de nutrientes para o seu desenvolvimento (MAIORKA et al., 2000). Desta maneira agentes tróficos como o probiótico estimulam o desenvolvimento da mucosa intestinal, melhorando o desempenho das aves que está relacionado com a ingestão, digestão e absorção dos nutrientes na primeira semana pós-eclosão.

Na fase inicial de criação das aves que compreendeu de 1 a 21 dias, as variáveis de desempenho não apresentaram nenhuma diferença ($p>0,05$), entre os tratamentos estudados (Tabela 2). Por outro lado, resultados diferentes foram relatados por APPELT et al. (2010) que verificaram melhor conversão alimentar de frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) quando alimentados com probióticos na ração, no entanto não observaram interação entre os níveis de probiótico e o tipo de ração. De acordo com LEANDRO et al. (2010) ovos embrionados inoculados com água ou probiótico se mostraram semelhantes aos estudos realizados utilizando probiótico na ração como promotor de crescimento e não proporcionaram vantagens para o desempenho das aves. Ainda no mesmo período de criação, CAMPOS et al. (2011) verificaram que as variáveis de desempenho não sofreram influência quando as aves eram inoculadas com soluções de açúcares, vitaminas e minerais, no entretanto quando essas soluções apresentavam maiores concentrações foi possível observar que as mesmas proporcionavam melhor conversão alimentar e aumento de 4,07% no ganho de peso.

Não foi observado efeito dos diferentes tratamentos ($p>0,05$) para peso final, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade para as fases finais de criação (1 a 35 e 1 a 42 dias), e índice de eficiência produtiva no período de 1 a 42 dias. Embora com probiótico adicionado na ração, RIGOBELLO et al. (2011) observaram menor consumo de ração e melhor conversão alimentar para frangos de corte em período final de criação quando comparado com aves tratadas com virginamicina e aves sem aditivos. SANTOS et al. (2010) avaliando a influência da inoculação *in ovo* com maltose, suplemento multivitamínico, glutamina, zinco-glicina, solução mista com todos os componentes, controle com cloreto de sódio e diferentes tamanhos de ovos não observaram influência no desempenho de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Assim na literatura pertinente existem trabalhos que não observaram diferença em relação a produtividade, embora faltam informações precisas como por exemplo: dosagem do probiótico, qual a bactéria envolvida, via de administração, veículo dentre outros fatores.

Tabela 2 – Peso inicial (PI), Peso final (PF), Ganho de peso (GP), Consumo de ração (CR), Conversão alimentar (CA), Viabilidade (VB) e Índice de eficiência produtiva (IEP) de frangos de corte aos 7, 21, 35 e 42 dias de idade submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico.

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS			MÉDIAS	p	CV (%)
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY			
1-7 DIAS						
PI (g)	43,12	43,54	42,71	43,12	0,274	2,33
PF (g)	144,79	143,71	141,25	143,25	0,679	5,71
GP (g)	101,67	100,17	98,54	100,13	0,755	8,27
CR (g)	122,92	119,02	121,25	121,06	0,601	6,32
CA	1,21AB	1,15B	1,23A	1,20	0,043	5,24
VB (%)	100,00	99,58	100,00	99,86	0,385	0,68
1-21 DIAS						
PF (g)	969,58	956,13	970,63	965,45	0,411	2,46
GP (g)	926,46	912,59	927,92	922,32	0,384	2,59
CR (g)	1208,98	1197,81	1216,25	1207,68	0,559	2,81
CA	1,30	1,30	1,31	1,31	0,689	1,50
VB (%)	99,58	98,75	100,00	99,44	0,133	1,21
1-35 DIAS						
PF (g)	2330,07	2319,59	2346,06	2331,91	0,463	1,81
GP (g)	2286,95	2276,05	2303,35	2288,78	0,442	1,84
CR (g)	3451,50	3450,78	3506,93	3469,74	0,126	1,74
CA	1,51	1,51	1,53	1,52	0,344	1,38
VB (%)	98,75	98,75	99,17	98,89	0,848	1,69
1-42 DIAS						
PF (g)	3038,37	3024,96	3056,81	3040,05	0,543	1,88
GP (g)	2995,24	2981,42	3014,10	2996,92	0,527	1,90
CR (g)	4810,08	4811,91	4882,27	4834,75	0,170	1,73
CA	1,61	1,62	1,62	1,62	0,505	1,14
VB (%)	98,33	98,33	99,17	98,61	0,539	1,73
IEP	434,66	431,51	438,27	434,81	0,618	3,13

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

2. Biometria entérica

Em relação ao desenvolvimento intestinal de frangos de corte ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade (Tabela 3 a 7), pode-se observar que os valores médios do comprimento e peso do intestino e seus segmentos ao nascimento e aos 42 dias de idade não foram influenciados pelos tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 3 e 7). Da mesma maneira, JAZIDEH et al. (2013) utilizando diferentes níveis de glutamina e estresse por calor, não encontraram diferença para o comprimento e peso relativo do intestino, aos 42 dias de idade e ZAVARIZE et al. (2011) suplementando com aminoácidos não essenciais a dieta de frangos de corte relatam que os pesos relativos dos órgãos e comprimento dos intestinos não foram influenciados pela inclusão aos 42 dias de idade. Resultados semelhantes também foram descritos por BORATTO et al. (2004), que não encontraram influência dos tratamentos, probiótico, homeopatia e antibiótico sobre o peso relativo total do intestino em aves inoculadas ou não com *Escherichia coli* aos 42 dias de idade.

Aos 7 dias de idade foi possível observar maior comprimento de duodeno no tratamento controle, diferindo apenas do tratamento pulverizado via spray (Tabela 4). Estudos realizados por JUNQUEIRA et al. (2001) sobre desempenho de frangos de corte alimentados com ovo em pó, na fase pré-inicial de criação, apresentaram menor peso e comprimento do intestino para as aves sem inclusão na dieta. Da mesma maneira, foi possível observar diferença ($p < 0,05$) do peso relativo do segmento do duodeno aos 7 dias de idade (Tabela 4), sendo encontrado maior valor para o tratamento controle, não diferindo do tratamento *in ovo*, resultado esse compatível com o de comprimento do duodeno no mesmo período. Resultados diferentes foram observados em estudos realizados por VIOLA et al. (2008) que constataram que o peso relativo do intestino delgado, do duodeno e do jejuno aos 7 dias de idade, nas aves alimentadas com a dieta controle, foi inferior ao daquelas sob suplementação com as misturas de ácidos orgânicos.

Aos 21 dias de idade observou-se diferença ($p < 0,05$) no comprimento do segmento de jejuno, sendo os maiores comprimentos encontrados no tratamento *in ovo*, porém sem diferir do tratamento pulverizado via spray (Tabela 5). Esses resultados diferiram dos encontrados por NUNES et al. (2011) ao avaliar em alometria de órgãos e biometria intestinal, na terceira semana de vida de frangos de corte, suplementados com diferentes níveis de farinha de batata doce que encontraram efeito negativo para peso corporal, comprimento intestinal e peso dos órgãos e quando suplementados com

complexo enzimático não observaram nenhuma influência na biometria do intestino. Não foi observado influência dos diferentes tratamentos ($p>0,05$) para o peso relativo do intestino e de seus segmentos aos 21 dias de idade (Tabela 5). VIOLA et al. (2008) em seus estudos realizados com adição de ácidos orgânicos em diferentes dietas de frangos de corte, verificaram aos 21 dias de idade diferença de peso relativo no segmento de duodeno para as aves alimentadas com dieta controle. Aos 35 dias de idade foi observado maiores comprimentos de jejuno e de íleo no tratamento controle, sendo que para os dois segmentos não houve diferença quando comparado com o tratamento pulverizado via spray, no entanto não foi possível observar influência dos diferentes tratamentos ($p>0,05$) para o peso relativo do intestino e de seus segmentos aos 35 dias de idade (Tabela 6).

Tabela 3 – Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento.

Comprimento do intestino e de seus segmentos (cm)						
SEGMENTOS	TRATAMENTOS			MÉDIA	p	CV (%)
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY			
DUODENO	6,73	6,27	6,80	6,60	0,104	11,03
JEJUNO	14,73	14,67	15,20	14,87	0,553	9,77
ÍLEO	13,87	13,73	13,87	13,82	0,961	10,85
CECO	3,40	3,40	3,40	3,40	1,000	17,46
COLON	2,47	2,67	2,67	2,60	0,453	19,14
ID	35,33	34,67	35,87	35,29	0,458	7,40
IG	5,87	6,07	6,07	6,00	0,703	12,49
TOTAL	41,20	40,73	41,93	41,29	0,511	6,87
Peso relativo do intestino e de seus segmentos (%) ¹						
DUODENO	1,11	1,02	1,11	1,08	0,242	14,81
JEJUNO	1,04	1,02	1,06	1,04	0,762	15,68
ÍLEO	0,84	0,84	0,85	0,84	0,956	18,44
CECO	0,78	0,65	0,62	0,68	0,222	38,87
COLON	0,55	0,49	0,46	0,50	0,621	55,76
ID	2,98	2,88	3,02	2,96	0,545	12,20
IG	1,33	1,14	1,07	1,18	0,230	35,82
TOTAL	4,32	4,02	4,10	4,14	0,447	15,92

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; ¹= % em relação ao peso vivo; ID= Intestino Delgado; IG= Intestino Grosso.

Tabela 4 - Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 7 dias de idade.

Comprimento do intestino e de seus segmentos (cm)						
SEGMENTOS	TRATAMENTOS			MÉDIA	p	CV (%)
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY			
DUODENO	16,07A	15,40AB	14,73B	15,40	0,044	9,13
JEJUNO	34,80	36,00	36,07	35,62	0,600	10,78
ÍLEO	31,60	32,07	29,67	31,11	0,275	13,73
CECO	6,53	6,60	6,20	6,44	0,275	11,16
COLON	3,50	3,60	3,27	3,46	0,369	18,96
ID	82,47	83,47	80,47	82,13	0,543	9,16
IG	10,03	10,20	9,47	9,90	0,147	10,61
TOTAL	92,50	93,67	89,93	92,03	0,431	8,67
Peso relativo do intestino e de seus segmentos (%) ¹						
DUODENO	3,00A	2,84AB	2,65B	2,83	0,044	12,80
JEJUNO	3,67	4,03	3,56	3,75	0,095	16,15
ÍLEO	2,99	2,69	2,76	2,81	0,145	15,32
CECO	1,13	1,04	0,96	1,04	0,329	29,58
COLON	0,42	0,44	0,41	0,42	0,759	29,01
ID	9,66	9,56	8,97	9,40	0,199	11,77
IG	1,55	1,48	1,37	1,13	0,370	24,04
TOTAL	11,21	11,03	10,34	10,86	0,159	11,80

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; ¹= % em relação ao peso vivo; ID= Intestino Delgado; IG= Intestino Grosso.

Tabela 5 - Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 21 dias de idade.

Comprimento do intestino e de seus segmentos (cm)						
SEGMENTOS	TRATAMENTOS			MÉDIA	p	CV (%)
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY			
DUODENO	20,50	21,13	20,07	20,57	0,439	11,02
JEJUNO	43,17B	48,00A	47,10AE	46,09	0,037	11,44
ÍLEO	45,13	46,73	44,20	45,35	0,526	13,52
CECO	11,30	11,40	11,10	11,27	0,757	9,75
COLON	5,03	5,33	5,40	5,26	0,414	15,16
ID	108,80	115,86	111,37	112,01	0,207	9,66
IG	16,33	16,73	16,50	16,52	0,730	8,35
TOTAL	125,13	132,59	127,87	128,53	0,214	8,99
Peso relativo do intestino e de seus segmentos (%) ¹						
DUODENO	1,28	1,16	1,16	1,20	0,071	13,13
JEJUNO	1,58	1,54	1,45	1,52	0,128	11,77
ÍLEO	1,32	1,40	1,27	1,33	0,131	12,99
CECO	0,57	0,67	0,58	0,61	0,136	24,48
COLON	0,18	0,19	0,18	0,19	0,903	15,94
ID	4,18	4,10	3,87	4,05	0,103	9,96
IG	0,75	0,86	0,76	0,79	0,119	18,92
TOTAL	4,94	4,96	4,64	4,85	0,132	9,91

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; ¹= % em relação ao peso vivo; ID= Intestino Delgado; IG= Intestino Grosso.

Tabela 6 - Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 35 dias de idade.

Comprimento do intestino e de seus segmentos (cm)						
SEGMENTOS	TRATAMENTOS			MÉDIA	p	CV (%)
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY			
DUODENO	23,10	23,30	22,33	22,91	0,457	9,65
JEJUNO	61,27A	54,60B	59,67AB	58,51	0,014	10,54
ÍLEO	65,30A	54,53B	60,90AB	60,24	0,001	12,11
CECO	15,83	14,67	14,70	15,07	0,075	10,27
COLON	6,33	6,47	6,10	6,30	0,469	13,00
ID	149,67A	132,43B	142,90AB	141,67	0,002	8,96
IG	22,17	21,13	20,80	21,37	0,173	9,55
TOTAL	171,83A	153,57B	163,70AB	163,03	0,003	8,45
Peso relativo do intestino e de seus segmentos (%) ¹						
DUODENO	0,74	0,80	0,73	0,76	0,132	13,92
JEJUNO	0,99	1,11	1,06	1,06	0,347	21,56
ÍLEO	0,89	1,00	0,97	0,95	0,171	17,53
CECO	0,40	0,48	0,40	0,42	0,060	24,17
COLON	0,14	0,15	0,13	0,14	0,412	22,14
ID	2,62	2,92	2,76	2,77	0,183	15,66
IG	0,53	0,62	0,53	0,56	0,068	21,28
TOTAL	3,16	3,54	3,29	3,33	0,118	15,28

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; ¹= % em relação ao peso vivo; ID= Intestino Delgado; IG= Intestino Grosso.

Tabela 7 - Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 42 dias de idade.

Comprimento do intestino e de seus segmentos (cm)						
SEGMENTOS	TRATAMENTOS			MÉDIA	p	CV (%)
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY			
DUODENO	24,97	23,23	25,87	24,69	0,141	14,64
JEJUNO	60,57	61,20	60,53	60,77	0,977	15,61
ÍLEO	60,90	57,40	58,60	58,97	0,611	16,54
CECO	16,00	14,63	15,33	15,32	0,154	12,36
COLON	7,43	6,93	7,07	7,14	0,176	10,43
ID	146,43	141,83	145,00	144,42	0,805	13,53
IG	23,43	21,57	22,40	22,47	0,072	9,63
TOTAL	153,87	148,77	152,07	151,57	0,772	12,94
Peso relativo do intestino e de seus segmentos (%) ¹						
DUODENO	0,67	0,66	0,72	0,68	0,179	13,10
JEJUNO	1,01	0,90	0,95	0,95	0,106	13,73
ÍLEO	0,86	0,87	0,82	0,85	0,599	15,32
CECO	0,46	0,46	0,49	0,47	0,543	23,85
COLON	0,18	0,19	0,15	0,17	0,220	29,60
ID	2,53	2,43	2,49	2,48	0,614	11,30
IG	0,64	0,63	0,64	0,64	0,966	21,86
TOTAL	3,17	3,06	3,13	3,08	0,119	4,94

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; ¹= % em relação ao peso vivo; ID= Intestino Delgado; IG= Intestino Grosso.

3. Rendimento de carcaça e cortes comerciais

Os resultados de rendimento de carcaça, peito, coxa e sobrecoxa, asas e dorso de frangos de corte no período total de criação (42 dias de idade) submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico encontram-se na Tabela 8. Foi possível observar que o rendimento de carcaça, e dos cortes comerciais não foram influenciados pelos tratamentos ($p>0,05$). Os resultados encontrados no presente estudo são concordantes com os de DOMINGUES et al. (2014) que também não observaram efeitos significativos sobre o rendimento de carcaça e cortes, quando estudaram a adição de probióticos às rações de frangos de corte. Da mesma maneira CASAGRANDE et al. (2014) estudando características de carcaça e qualidade de carne de frangos de corte alimentados com probiótico e/ou ácido orgânico após os 21 dias de idade, não encontraram diferença no rendimento de carcaça e cortes das aves tratadas com diferentes aditivos.

Estudos avaliando o uso de probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte realizado por SOUZA et al. (2010), também não encontraram efeito significativo do probiótico ou antibiótico promotor de crescimento em relação ao controle sobre os parâmetros avaliados, mostrando que o probiótico e o antibiótico promotor de crescimento foram equivalentes, mas não foram vantajosos em relação ao grupo controle. Testes realizados com inclusão de probiótico em rações de origem animal e vegetal para frangos de corte, verificaram que o rendimento de carcaça inteira e de cortes nobres (peito, coxa e sobrecoxa) e a porcentagem de gordura abdominal de frangos de corte abatidos aos 40 dias de idade, de maneira similar aos resultados do presente estudo, não foram afetados pela interação entre a inclusão deste aditivo e o tipo de ração (APPLET et al., 2010). Por outro lado, ROCHA et al. (2010) avaliando a inclusão de prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos nas rações de frangos de corte, relataram que as aves que receberam a mistura de probióticos apresentaram melhor rendimento de peito do que as que receberam a dieta basal sem aditivos.

Tabela 8 - Rendimento de carcaça de frangos de corte aos 42 dias de idade submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico.

VARIÁVEIS (%)	CONTROLE	<i>IN OVO</i>	SPRAY	MÉDIA	P	CV (%)
Carcaça	74,32	74,38	73,98	74,23	0,962	7,46
Peito	42,41	42,09	41,92	42,14	0,866	7,85
Dorso	18,49	18,19	18,71	18,46	0,600	9,92
Asa	9,71	9,93	10,65	10,10	0,329	22,85
Coxa e Sobrecoxa	28,47	29,37	29,99	29,28	0,078	8,04

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

Conclusão

O uso de probiótico através de inoculação *in ovo*, atuou no desempenho melhorando a conversão alimentar e biometria entérica somente na fase inicial de criação.

Referências

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 20014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> Acesso em 10 Jan. 2015.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; MESSTRIEL JUNIOR, P.; SAMPAIO, H.M.; CROCCI, A.J. Efeito da vacina contra coccidiose sobre a colonização de *Salmonella enteritidis* em aves inoculadas com microbiota cecal anaeróbica. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.311-316, 1999.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA E.N. DA; RIBEIRO, A.R.; KONDO, N.; CURI, P.R. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal Microbiology**, v.31, p.107-112, 2000.
- 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, cap.15, p.225-248, 2005.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbica no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.661-672, 1997.
- APPELT, M.D.; NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; SILVA, W.T.M.; Iderson 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, 2010.
- BENEVIDES, W.S. Integridade intestinal de frangos de corte quanto ao uso de novos aditivos nas dietas modernas. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/integridade-intestinal-frangos-corte-t2085/141-p0.htm> Acesso em: 30 Jun. 2014.
- BORATTO, A.J.; LOPES, D.C.; OLIVEIRA, R.F.M.; ALBINO, L.F.T.; SÁ, L.M.; OLIVEIRA, G.A. Uso de Antibiótico, de Probiótico e de Homeopatia, em Frangos de

- Corte Criados em Ambiente de Conforto, Inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1477-1485, 2004.
- CAMPOS, A.M.A.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; SILVA, E.A.; ALBINO, L.F.T.; NOGUEIRA, E.T. Efeito da inoculação de soluções nutritivas *in ovo* sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.8, p.1712-1717, 2011.
- CASAGRANDE, T.L.; OBA, A.; BARBOSA FILHO, J.A.; COLCETTA, B.; DINALLI, V.P.; CARNEIRO, A.K.F.; SILVA, L.M.; SCHNEIDER, G.L. Características de carcaça e qualidade de carne de frangos de corte alimentados com probiótico e/ou ácido orgânico após os 21 dias de idade. Em: XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia, Vitória, ES. **Anais...2014**.
- CRUZ, C.P.; STRINGHINI, J.H.; XAVIER, S.A.G.; LEANDRO, N.S.M; GONZALES, E. Aplicação de probiótico em ovos embrionados de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Suplemento 5, p.12, 2003.
- DING, X.; LILLEHOJ, H.S.; DALLOUL, R.A.; MIN, W.; SATO, T.; YASUDA, A.; LILLEHOJ, E.P. In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. **Vaccine**. v.23(28), p.3733-3740, 2005.
- DOMINGUES, C.H.F.; SANTOS, E.T.; CASTIBLANCO, D.M.C.; QUADROS, T.C.O.; PETROLLI, T.G.; DUARTE, K.F.; JUNQUEIRA, O.M. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo probiótico nas diferentes fases de criação. **Revista Agrocientífica**, v.1, n.1, jan./jun., p.7-16, 2014.
- EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.2, p.75-97, 2003.
- FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. **British Poultry Science**, v.1, p.85-94, 1977.

- INOOKA, S.; UEHARA, S.; KIMURA, M. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. **Poultry Science**, v.65, p.1217-1219, 1986.
- JAZIDEH, F.; DANESHYAR, M.; FARHOOMAND, P.; NAJAFI G. The effects of dietary glutamine supplementation on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens reared under hot condition. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, n.1, p.210-32, 2013.
- JUNQUEIRA, O.M.; ARAÚJO, L.F.; ARAÚJO, C.S.S.; FARIA, D.E.; LAURENTIZ, A.C.; DAHLKE, F. Desempenho de Frangos de Corte Alimentados com Ovo em Pó. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3 n.1 Campinas Jan./Apr. 2001.
- LEANDRO, N.S.M.; OLIVEIRA, A.S.C.; GONZALES, E.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H.; ANDRADE, M.A. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados. Desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1509-1516, 2010.
- MAIORKA, A.; FISCHER DA SILVA, A.V.; SANTIN, E.; BORGES, A.S.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Influência da suplementação de Glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.487-490, 2000.
- NUNES, A.D.; VAZ A.C.N.; RASPANTINI, L.E.; SILVA, E.M.; ALBUQUERQUE, R. Desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte alimentados com rações contendo aditivos alternativos a antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.46, n.6, p.500-506, 2009.
- NUNES, J.K.; GONÇALVES, F.M.; DALLMANN, H.M.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F.; MAIER, J.C.; SILVA, J.G.C. da. Desenvolvimento do sistema digestório de frangos de corte alimentados com farinha de batata doce. **Archivos de Zootecnia**, v.60 (232) p.1105-1114, 2011.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; MEDICI, M.; HOLGADO, A.A.P.R. Influence of the use of *Lactobacillus casei* as an oral adjuvant on the levels of secretory immunoglobulin

- A during an infection with *Salmonella typhimurium*. **Food Agriculture Immunologic**, v.5, p.27-37, 1993.
- RAMOS, L.S.N.; LOPES, J.B.; SILVA, S.M.M.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, 2011.
- RIGOBELLO, E.C.; MALUTA, R.P.; ÁVILA, F.A. Desempenho de frangos de corte suplementadas com probiótico. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.27, n.2, p.111-115, 2011.
- ROCHA, A.P.; ABREU, R.D.; COSTA, M.C.M.M. da; OLIVEIRA, G.J.C. de; ALBINATI, R.C.B.; PAZ, A.S. da; QUEIROZ, L.G. de; PEDREIRA, T.M. Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.11, n.3, p.793-801 jul/set, 2010.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa-MG: UFV, 252p, 2011.
- SANTOS, T.T.; CORZO, A.; KIDD, M.T.; MCDANIEL, C.D.; TORRES Filho, R.A.; ARAÚJO, L.F. Influence of *in ovo* inoculation with various nutrients and egg size on broiler performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.19, p.1–12, 2010.
- SOUZA, L.F.A.; ARAÚJO, D.N.; ASTOLPHI, J.L.L.; DIAS, L.B.M.; AMBIEL, A.C.; SANTOS, L.S.; CARMO, A.J.; SILVA, P.C.G. Probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte. **Colloquium Agrariae**, v.6, n.2, p.33-39, Jul-Dez, 2010.
- Statistical Analysis System. **SAS User's Guide**: Verson 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.

VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L.; TORRES, C.A.; FREITAS, D.M.; BERRES, J. Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos láctico, fórmico, acético e fosfórico no alimento ou na água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.296-302, 2008.

WATKINS, B.A. & MILLER, B.F. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. **Poultry Science**, v.61, p.1772-1779, 1983.

ZAVARIZE, K.C.; SARTORI, J.R.; PELÍCIA, V.C.; PEZZATO, A.C.; ARAUJO, P.C.; STRADIOTTI, A.C.; MADEIRA, L.A. Glutamina e nucleotídeos na dieta de frangos de corte criados no sistema alternativo. **Arquivos de Zootecnia**, v.60, n.232, p.913-920, 2011.

CAPÍTULO 3

**HISTOMORFOMETRIA E ULTRAESTRUTURA DA MUCOSA INTESTINAL EM
FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE
PROBIÓTICO E DESAFIADOS COM *Salmonella* Enteritidis**

HISTOMORFOMETRIA E ULTRAESTRUTURA DA MUCOSA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIFERENTES VIAS DE APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO E DESAFIADOS COM *Salmonella* Enteritidis

Resumo – Com o objetivo de avaliar histomorfometria, a integridade entérica de frangos de corte e a eficácia do probiótico frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis, foram alojados 720 pintos em aviário experimental e 45 pintos em infectório, machos, de um dia, da linhagem Cobb[®]. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos para ambos os estudos, constando 8 repetições de 30 aves cada para a avaliação sem desafio e de 15 aves cada para a avaliação com desafio. Foram utilizadas amostras de *Salmonella* Enteritidis e as aves foram desafiadas por inoculação intraesofágica, no 3º dia de idade. Os tratamentos foram: T1 (controle): pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek; T2: pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico no 18º dia de incubação utilizando como diluente a vacina de Marek; T3: pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek e pulverizados ao nascimento com solução contendo probiótico. Foram utilizadas 15 aves por experimento nas diversas fases estudadas, para as análises histomorfométricas, contagem do número de células, integridade intestinal e avaliação microbiológica. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, sendo os dados de contagem de células e análise microbiológica submetidos a teste de Kruskal-Wallis. O probiótico influenciou a contagem do número de células caliciformes, porém sem alterar a morfometria e o número de enterócitos. A integridade da mucosa cecal das aves submetidas aos tratamentos com probiótico mostrou-se melhor preservada quando comparada a mucosa cecal das aves do tratamento controle. A avaliação microbiológica do conteúdo cecal aos 7 dias de idade, mostrou que o tratamento com probiótico pulverizado via spray apresentou menor contagem para *Salmonella* spp. quando comparado com os demais tratamentos. A utilização de probiótico melhorou a integridade da mucosa cecal de frangos de corte nas diferentes fases de criação e mostrou maior eficácia em estabelecer microbiota protetora no controle de *Salmonella* Enteritidis aos 7 dias de idade.

Palavra-chave: agente trófico, aves, células caliciformes, enterócitos, exclusão competitiva.

HISTOMORPHOMETRIC AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF INTESTINAL MUCOSA OF BROILERS SUBMITTED TO PROBIOTIC TREATMENT BY DIFFERENT ROUTES AND CHALLENGED WITH *Salmonella* Enteritidis

Abstract - This study evaluated intestinal integrity and histomorphometric aspects of broilers treated with probiotics and compared the efficacy of probiotics in broilers challenged or not with *Salmonella* Enteritidis. Day-old male Cobb® chicks were housed in experimental poultry house or quarantine facilities (n=720 and n=45 respectively); all chicks were assigned to one of three treatments, with eight replications per treatment and 30 (non-challenged) or 15 (challenged) birds per pen in a completely randomized design. Treatments consisted of vaccination *in ovo* against Marek's disease on day 18 of incubation (T1, control), inoculation *in ovo* with probiotics diluted in Marek's disease vaccine on day 18 of incubation (T2), or vaccination *in ovo* against Marek's disease on day 18 of incubation and spraying with probiotic solution at hatching (T3). Birds were challenged via intraesophageal inoculation of *Salmonella* Enteritidis samples at 3 days of age. Fifteen challenged and 15 non-challenged birds (5 birds per treatment group respectively) were submitted to histomorphometric analysis, cell counting, intestinal integrity determination and microbiological assessment at the different time points considered. Data were treated using analysis of variance and means compared using the Tukey test (5% significance level); cell counting and microbiological data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Probiotic treatment affected goblet cell counts, but not enterocyte counts and morphometry. Cecal mucosa integrity was better preserved in probiotic treated birds compared to birds submitted to the control treatment. Microbiological analysis of cecal contents at 7 days of age revealed significantly lower *Salmonella* spp. counts in birds submitted to T3 than in birds submitted to T2 or T1 (control). Probiotic treatment enhanced cecal mucosa integrity of broilers at different stages of rearing and was more effective in fostering the establishment of microbiota protective against *Salmonella* Enteritidis at 7 days of age.

Keywords: broilers, competitive exclusion, enterocytes, goblet cells, trophic agen.

Introdução

A sobrevivência e o bom desempenho das aves dependem da obtenção adequada de energia e compostos químicos pelo organismo. Para que isso ocorra é necessário que o trato digestivo apresente características estruturais funcionais desde a ingestão dos alimentos até a sua absorção (PELICANO et al., 2003).

A saúde intestinal atualmente é objeto de grande estudo e atenção intensa da agroindústria avícola. O termo saúde intestinal está relacionado ao desenvolvimento e integridade da mucosa, além da relação com a composição da microbiota intestinal e da atuação do sistema imune (MURAROLLI, 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

Após a eclosão, as mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem no trato gastrointestinal são importantes para proporcionarem aumento na superfície de digestão e absorção (MACARI et al., 2002), visto que na primeira semana de vida dos frangos de corte, o crescimento alométrico do intestino delgado e do fígado é quatro e duas vezes maior, respectivamente, em relação ao peso corporal (NIR et al., 1993; NUNES et al., 2011).

A mucosa entérica apresenta-se constituída por três tipos celulares, com funções distintas: enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. Os enterócitos são células absorptivas que realizam a digestão final do alimento, bem como o transporte transepitelial dos nutrientes a partir do lúmen (BOARO, 2009). As células caliciformes são de suma importância na manutenção e desenvolvimento do epitélio intestinal, pois são secretoras de muco e possuem funções de proteger o epitélio intestinal durante o processo de digestão; proteção contra infecções (ao funcionar como barreira protetora impedindo o contato de microrganismos com células epiteliais (FURLAN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2012). Por último as células enteroendócrinas são produtoras de hormônios peptídicos que auxiliam a regulação dos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes. O tamanho dos vilos depende do número de células que o compõem. Desta forma, quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilos, e conseqüentemente maior área de absorção de nutrientes. A integridade funcional das células dos vilos, garantirá uma absorção efetiva, tanto na membrana luminal quanto na membrana basolateral dos enterócitos (BOARO, 2009).

Já está bem estabelecido que o desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de dois eventos citológicos primários associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões mitóticas sofridas por células

totipotentes localizadas na cripta e ao longo dos vilos (MAIORKA et al., 2001) e a perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos. O equilíbrio entre esses dois processos é determinado por uma taxa de renovação constante e, portanto, a capacidade digestiva e de absorção intestinal (PELICANO et al., 2003). Desta forma o desenvolvimento da mucosa intestinal consiste no aumento da altura e no número de vilos, que por sua vez, estão relacionados com o número dos diferentes tipos celulares presente no epitélio da mucosa entérica.

A Salmonelose é uma enfermidade de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias e se constitui em importante barreira ao comércio internacional de alimentos devido seu potencial zoonótico. A ampla distribuição de *Salmonella* entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (BUTAYE et al., 2003; ANDREATTI et al., 2009).

O uso de probióticos para controle de infecções intestinais apresentou resultados consistentes, demonstrando sua habilidade em diminuir a colonização intestinal por bactérias do gênero *Salmonella* sp. (BERCHIERI & BARROW, 1998). Em estudos realizados com probióticos na ração ou inoculados em ovos embrionados, LEANDRO et al. (2010), preconiza que o uso de probiótico promove a eliminação de *Salmonella* Enteritidis em alguns segmentos do trato gastrointestinal. Por outro lado OKAMOTO et al. (2009), relata que a regeneração da vilosidade intestinal após desafio com *Salmonella* Enteritidis se mostrou independente do tratamento com *Lactobacillus* spp. A inoculação *in ovo* é uma prática recente na avicultura, e consiste em injetar o nutriente no líquido amniótico por meio de uma máquina injetora. Na literatura muitos são os trabalhos realizados com desafio de *Salmonella*, entretanto ainda não há um consenso sobre a concentração de UFC/mL a ser utilizada.

Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar a histomorfometria e ultraestrutura da mucosa intestinal em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico analisando a integridade intestinal, bem como avaliar o efeito da administração do probiótico sobre o controle de *Salmonella* em frangos de corte.

Material e Métodos

Um experimento foi realizado no incubatório de uma empresa matrizeira do Estado de São Paulo, com ovos oriundos de matrizes Cobb® com 39 semanas. No 18º dia de incubação, no momento da transferência, os ovos com peso médio de 64 g foram selecionados após a realização da ovoscopia e colocados em bandejas de nascimento com capacidade de 96 ovos cada. A seguir, os mesmos foram vacinados contra a doença de Marek com vacina aplicada *in ovo* no 18º dia de incubação por meio de injetora comercial.

Após o nascimento, 720 aves foram alojadas no aviário experimental da FMVZ-UNESP/Botucatu, sendo pintos de um dia de idade, machos da linhagem Cobb® criados até 42 dias de idade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 8 repetições de 30 aves cada.

O aviário experimental possui 40m de comprimento por 8m de largura, e pé direito de 3,50m e possui 48 boxes. Na ocasião deste trabalho o tamanho dos boxes foi adequado para a densidade de 12 aves por m². Cada boxe foi equipado com um comedouro tubular com capacidade para 20 kg de ração e um bebedouro pendular. O aviário experimental é dotado de ventiladores distribuídos de forma a promover uma ventilação homogênea em todos os boxes.

O sistema de manejo adotado foi o tradicionalmente utilizado nas criações comerciais de frangos de corte. Durante a primeira semana de idade foram utilizados bebedouros do tipo pendular e comedouros tubulares infantis. A partir da segunda semana, foram utilizados bebedouros pendulares e comedouros tubulares. O aquecimento inicial foi feito através de campânulas elétricas providas de lâmpadas infravermelhas de 250W até o final da segunda semana, uma em cada boxe. A iluminação artificial do galpão foi fornecida de forma a completar 23 horas de luz durante a primeira semana, 22 horas de luz na segunda e terceira semanas e 20 horas de luz a partir da quarta semana de criação, utilizando-se lâmpadas de 40W, de forma a se obter 22 lumens/m². A cama utilizada foi de maravalha nova.

O experimento com desafio foi realizado no infectório do Centro de Pesquisa em Animais do Brasil – CPABR – Amparo/SP, com 45 pintos de um dia de idade, machos da linhagem Cobb®, criados até os 35 dias de idade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos de 15 aves cada, sendo que cada ave representou uma unidade experimental. Foram utilizadas amostras de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 04, isolada de

fígado de matrizes pesadas, resistente a 100µg de ácido nalidíxico (Nal/mL) (WEINACK et al., 1982; ANDREATTI FILHO et al., 1993). O inóculo nos tratamentos consistiu no cultivo bacteriano em caldo infusão de cérebro e coração incubado a 40°C por 12 horas. Todas as aves receberam $1,35 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (UFC; UFC/ave) da bactéria. O número de UFC do inóculo foi determinado por meio de plaqueamento de 0,1mL da suspensão bacteriana e respectivas diluições decimais em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 em duplicata de ágar verde brilhante acrescido de 100µg de Nal/mL. As aves foram desafiadas por inoculação intraesofágica com 0,5mL da suspensão bacteriana, com auxílio de pipeta de 1mL, no terceiro dia de idade.

Os tratamentos utilizados para ambos os experimentos foram: T1 (controle): pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek; T2: pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico no 18º dia de incubação utilizando como diluente a vacina de Marek; T3: pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek e pulverizados ao nascimento com solução contendo probiótico (o mesmo utilizado para a inoculação *in ovo*). O objetivo do T3 foi testar a via de aplicação do probiótico. O probiótico utilizado foi um produto comercial que possui em sua composição flora definida com 21 cepas (*Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus delbrueckii*; *Lactobacillus plantarum* (3 cepas); *Lactobacillus reuteri* (5 cepas); *Lactobacillus salivarius*; *Pediococcus acidilactici* (3 cepas); *Enterococcus faecium* (6 cepas); *Bacillus subtilis*, sendo inoculado 0,05ml/ovo.

As rações experimentais foram produzidas na Fábrica de Rações Experimentais da FMVZ/UNESP. O arraçoamento foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1-7 dias), inicial (8-21 dias), crescimento (22-35 dias) e final (36-42 dias), seguindo as recomendações de composição e exigências nutricionais das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos de ROSTAGNO et al. (2011). As aves receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental (Tabela 1).

O experimento foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (protocolo 99/2013 – CEUA), determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus Botucatu.

Tabela 1 – Composições centesimais e nutricionais calculadas das rações basais.

INGREDIENTES	Fases			
	Pré-Inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)	Crescimento (22 a 35 dias)	Final (36 a 42 dias)
Milho moído	55,604	59,003	61,399	65,413
Óleo de soja	1,900	2,200	3,200	3,300
Farelo de Soja (45%)	38,360	34,900	31,600	27,630
Sal refinado	0,490	0,470	0,440	0,430
Calcário calcítico	0,807	0,824	0,854	0,885
Fosfato bicálcico	1,900	1,850	1,800	1,700
Cloreto de colina (60%)	0,060	0,060	0,050	0,050
DL - Metionina	0,352	0,282	0,253	0,238
L - Lisina HCl	0,276	0,209	0,186	0,222
L-Treonina	0,101	0,057	0,038	0,047
Suplemento vitamínico ¹	0,050	0,045	0,035	0,035
Suplemento mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050
Anticoccidiano ³	0,050	0,050	0,050	-
TOTAL (kg)	100,000	100,000	100,000	100,000
Composição nutricional calculada				
NUTRIENTES	Valores			
Proteína bruta (%)	22,200	20,799	19,494	17,999
Energia met.ap. ⁴ (kcal/kg)	2950	3007	3104	3158
Sódio (Na) (%)	0,219	0,210	0,198	0,193
Cálcio (%)	0,953	0,937	0,927	0,901
Fósforo útil (%)	0,452	0,438	0,424	0,400
Lisina digestível (%)	1,310	1,174	1,078	1,010
Metionina digestível (%)	0,643	0,560	0,517	0,486
Met.+Cist ⁵ digestível (%)	0,943	0,845	0,787	0,737
Triptofano digestível (%)	0,250	0,232	0,214	0,193
Treonina digestível (%)	0,851	0,763	0,701	0,656

¹Suplemento vitamínico: PX VIT FC 0,5 kg/ton (VACCINAR[®]) níveis de garantia por kg de ração para a fase pré-inicial: ácido fólico 0,8 mg; ácido pantotênico 14,5 mg; BHT 2,5 mg; biotina 0,03 mg; niacina 43,5 mg; vit. A 10000 UI; vit. B1 1,5 mg; vit. B12 14µg; vit. B2 6 mg; vit. B6 3 mg; vit. D3 2500 UI; vit. E 20,25 UI; vit. K3 2,4 mg. PX VIT FC 0,45 kg/ton (VACCINAR[®]) níveis de garantia por kg de ração para a fase inicial: ácido fólico 0,72 mg; ácido pantotênico 13,05 mg; BHT 2,25 mg; biotina 0,027 mg; niacina 39,15 mg; vit. A 9000 UI; vit. B1 1,35 mg; vit. B12 12,6 µg; vit. B2 5,4 mg; vit. B6 2,7 mg; vit. D3 2250 UI; vit. E 18,22 UI; vit. K3 2,16 mg. PX VIT FC 0,35 kg/ton (VACCINAR[®]) níveis de garantia por kg de ração para a fases de crescimento e final: ácido fólico 0,56 mg; ácido pantotênico 10,15 mg; BHT 1,75 mg; biotina 0,021 mg; niacina 30,45 mg; vit. A 7000 UI; vit. B1 1,05 mg; vit. B12 9,8 µg; vit. B2 4,2 mg; vit. B6 2,1 mg; vit. D3 1750 UI; vit. E 14,17 UI; vit. K3 1,68 mg. ²Suplemento mineral: PX MINERAL FC 0,5 kg/ton (VACCINAR[®]) níveis de garantia por kg de ração: cobre 10 mg; ferro 48 mg; iodo 0,7 mg; manganês 78 mg; selênio 0,25 mg; zinco 55 mg. ³Coxistac 12%; Energia Met. Ap.= Energia metabolizável aparente; ⁵Met + Cist= Metionina + Cistina.

1. Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes e enterócitos na mucosa intestinal

Para as análises histomorfométricas e contagem do número de células caliciformes e enterócitos da mucosa intestinal, as aves foram submetidas a jejum de 6 horas, posteriormente foram transportadas para o abatedouro experimental da FMVZ/UNESP-Botucatu, pesadas para obtenção do peso vivo, insensibilizadas por eletronarcole e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida. Em seguida foram coletados segmentos de aproximadamente 2 cm do intestino delgado (duodeno: a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal; jejuno: a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel; íleo: entre o divertículo de Meckel e a abertura dos cecos) de 5 aves por tratamento das aves desafiadas e não desafiadas, nas diversas fases de criação (nascimento 7, 21, 35 e 42 dias de idade, sendo nascimento e 42 dias apenas para as aves não desafiadas), os quais foram abertos pela borda mesentérica e lavados com água destilada, posteriormente fixados em placas de polipropileno e mergulhados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após esse período, o material foi reduzido a fim de eliminar as bordas dilaceradas e foram lavados em água corrente por 48 horas, com a finalidade de retirar o fixador utilizado.

Após fixação e secção, todo material foi desidratado por imersão em uma série crescente de álcoois (entre 70% e absoluto), diafanizado em três trocas de xilol e incluído em parafina. Para a inclusão os segmentos foram orientados para obtenção de cortes histológicos longitudinais, em relação ao maior eixo do intestino.

A microtomia foi realizada com auxílio de micrótomo automático (Leica, RM-2145) equipado com navalhas descartáveis, obtendo-se uma série de cortes com 4-5 µm de espessura. Os cortes foram colocados em álcool 30%, em seguida imersos em água destilada a 37°C e, posteriormente, distendidos sobre lâminas histológicas e levados para estufa, onde permaneceram por 60 minutos a uma temperatura de 60°C. Após esses procedimentos os cortes sofreram a desparafinização, através de duas passagens pelo xilol. Posteriormente, foram hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e submetidos aos métodos de colorações histológicas. Os cortes histológicos foram corados com Tricrômico de Masson, de acordo com a metodologia preconizada por BEHMER et al. (2003).

A morfometria da mucosa foi obtida através das análises dos cortes histológicos realizadas com auxílio do microscópio óptico acoplado a um sistema

computadorizado de captura de imagem (Leica DM 750). Foram realizadas 15 medidas de cada lâmina estudada.

A contagem do número de células caliciformes e enterócitos foi realizada em 10 campos por lâmina nos diferentes segmentos do intestino delgado. Após a captura da imagem através de um fotomicroscópio a contagem do número de células foi realizada com o auxílio de um aplicativo.

2. Avaliação ultraestrutural da integridade entérica

Nas fases estudadas 5 aves por tratamento das aves desafiadas e não desafiadas, nas diversas fases de criação (nascimento 7, 21, 35 e 42 dias de idade, sendo nascimento e 42 dias apenas para as aves não desafiadas), foram coletadas amostras do segmento do ceco, as quais foram processadas no Laboratório do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP. Para isso as aves foram submetidas a jejum de 6 horas, posteriormente foram transportadas para o abatedouro experimental da FMVZ/UNESP-Botucatu, pesadas para obtenção do peso vivo, insensibilizadas por eletronarcole e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida. As amostras foram abertas longitudinalmente, esticadas e brevemente lavadas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) para remover o conteúdo intestinal. Os segmentos foram fixados por 24 horas a 4 °C em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). Após a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada e fixadas por 30 minutos em tetróxido de ósmio 0,5% em água deionizada. O material foi desidratado em uma série crescente de álcool (7,5 % a 100%), e em seguida submetido à secagem com dióxido de carbono líquido em um aparelho de ponto crítico de secagem Balzers CPD-020, montados em “stubs” de cobre, e metalizados com 10 nm de ouro usando um Metalizador SCD-050 da Bal-Tec. Após o processamento as amostras foram examinadas e fotografadas usando um microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 da FEI, sob tensão de 10 a 15 KV, e analisadas as imagens quanto à integridade da mucosa dos cecos.

3. Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no Instituto Biológico de Descalvado, sendo que as aves foram submetidas a jejum de 6 horas, pesadas para obtenção do peso vivo, insensibilizadas por eletronarcole e eutanasiadas por corte da

veia jugular e artéria carótida. Foram coletados conteúdo cecal de 5 aves por tratamento, aos 7, 21 e 35 dias de idade das aves inoculadas no 3º dia de idade com *Salmonella* Enteritidis, sendo que cada ave representou uma unidade experimental totalizando 15 amostras por período, para análise de contagem de *Salmonella* spp. Nas fases estudadas as aves foram eutanasiadas e necropsiadas, e em seguida foram coletadas assepticamente, um dos cecos com a finalidade de obtenção do seu conteúdo para análise de contagem de *Salmonella*. Para realização do procedimento o conteúdo cecal foi pesado em balança semi-analítica e diluído em água peptonada tamponada na proporção de 1:10, imediatamente após a coleta. As amostras foram submetidas a diluições seriadas na base 10, até a diluição 10⁻⁹. Foram semeados 100µL de cada diluição em agar verde brilhante (VB) contendo 100µg de ácido nalidíxico/mL de meio (Nal/mL). As placas foram incubadas a 36±1°C/24horas.

A contagem foi feita após o período de incubação, e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama foi calculado segundo o fator de diluição da placa selecionada para contagem.

Os resultados das contagens de colônias foram realizados de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia conforme a Normativa nº 62 publicada em 26 de agosto de 2003 (MAPA, 2003).

4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional Statistical Analysis System (2009). As diferenças entre as médias foram submetidas ao teste *Tukey*, utilizando o procedimento GLM (*General Linear Models*) ao nível de significância de 5%.

Para os resultados de contagem de número de células e análise microbiológica, os dados foram submetidos a teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e quando necessário comparado pelo teste de Mann-Whitney ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

1. Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes e enterócitos

1.1 Histomorfometria entérica

Os valores médios da histomorfometria da mucosa entérica dos diferentes segmentos do intestino delgado de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis estão apresentados na Tabela 2.

Não foi possível observar diferença ($p>0,05$) na histomorfometria da mucosa dos diferentes segmentos do intestino delgado com o uso de probiótico, nas diferentes fases estudadas. Esses resultados, são semelhantes aos encontrados por PELICANO et al. (2003) sobre a morfometria da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos, no qual constatou que os diferentes probióticos administrados na ração não afetaram a altura de vilos nos diferentes segmentos intestinais. MEZALIRA et al. (2014) ao avaliar a morfometria entérica (altura de vilo e profundidade de cripta), também não evidenciaram diferença significativa entre os tratamentos nos segmentos do intestino delgado (duodeno e jejuno) de pintos de corte recebendo dietas suplementadas ou não com probiótico (*Lactobacillus* spp.) e/ou prebiótico (betaglucano) no período de um a sete dias de idade. De maneira similar, NUNES et al. (2009) trabalhando com probiótico composto de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum* e prebiótico (mananoligossacarídeo), derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, não verificaram benefícios da suplementação de probiótico e/ou prebiótico na dieta dos animais em relação à altura de vilo e profundidade de cripta do duodeno e jejuno aos 42 dias de idade. Por outro lado, os resultados divergem dos encontrados em trabalho realizado por RAMOS et al. (2011), no qual avaliou diferentes melhoradores de crescimento e verificou maior altura de vilo de duodeno para frangos de corte tratados com probiótico quando comparado com os tratados com prebiótico no período de 1-21 dias. Não foi observado entretanto, diferença para os segmentos de jejuno e íleo.

Tabela 2 - Valores médios da morfometria entérica de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

SEGMENTOS	TRATAMENTOS			MÉDIA	p	CV (%)
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY			
Nascimento						
DUODENO	451,64	496,83	507,59	485,35	0,424	14,25
JEJUNO	395,31	412,08	401,29	402,89	0,919	16,19
ÍLEO	303,44	320,65	276,00	300,02	0,397	16,79
7 dias						
DUODENO	1394,20	1283,90	1126,00	1268,04	0,072	13,07
JEJUNO	1071,30	1107,40	1126,80	1101,83	0,901	17,62
ÍLEO	736,02	682,80	704,69	707,83	0,698	13,88
7 dias com desafio						
DUODENO	1244,80	1219,33	1218,01	1227,37	0,926	9,89
JEJUNO	1081,88	961,76	1014,38	1019,33	0,443	14,15
ÍLEO	653,17	675,62	653,70	660,82	0,829	9,93
21 dias						
DUODENO	1887,40	1762,60	1907,40	1852,46	0,596	12,89
JEJUNO	1590,10	1359,40	1554,10	1501,19	0,356	17,40
ÍLEO	1000,62	1031,37	1012,52	1014,83	0,938	13,42
21 dias com desafio						
DUODENO	1919,03	1868,03	1818,84	1868,63	0,158	4,07
JEJUNO	1498,10	1312,50	1158,80	1323,14	0,076	16,01
ÍLEO	1046,60	880,30	930,60	952,47	0,282	16,87
35 dias						
DUODENO	2034,10	1861,70	2057,50	1984,43	0,632	17,43
JEJUNO	1595,00	1700,30	1683,10	1659,47	0,646	11,31
ÍLEO	1239,06	1336,78	1219,45	1265,09	0,350	10,37
35 dias com desafio						
DUODENO	1978,70	1731,60	1983,20	1900,84	0,060	9,08
JEJUNO	1629,80	1415,10	1564,20	1536,36	0,655	24,19
ÍLEO	1011,69	1017,34	1057,36	1028,79	0,443	5,80
42 dias						
DUODENO	2098,70	2138,30	2149,80	2128,91	0,906	8,92
JEJUNO	1988,80	1918,50	1799,50	1902,27	0,252	9,03
ÍLEO	1118,90	953,30	1130,40	1067,53	0,553	26,31

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); p= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

1.2 Contagem do número de células caliciformes e enterócitos

Os resultados referentes à contagem do número de células caliciformes e enterócitos estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

A parede intestinal é revestida de uma densa camada de vilos composta de enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas (BOARO, 2009). As células caliciformes presentes nos vilos e criptas são de suma importância na manutenção e desenvolvimento do epitélio intestinal. Estas células são secretoras de muco e possuem funções de proteger o epitélio intestinal durante o processo de digestão e proteção contra infecções ao funcionar como barreira protetora impedindo o contato de microrganismos com células epiteliais. Deste modo, às células caliciformes aumentam a produção de muco, caso ocorra alteração na dieta, ou o animal seja submetido ao jejum, pois estas situações podem acarretar diminuição na camada de muco e propiciar ação de bactérias e protozoários patogênicos que causam destruição da mucosa (FURLAN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2012). Os enterócitos são células que atuam na digestão final do alimento e no transporte transepitelial dos nutrientes a partir do lúmen, sendo que estas células possuem um processo de maturação que ocorre durante o processo de migração da cripta para o ápice do vilos (MAIORKA, 2004).

Ao nascimento para todos os segmentos estudados do intestino delgado foi possível observar maior contagem do número de células caliciformes ($p < 0,05$) nas aves tratadas com probiótico independente da via de aplicação. Já aos 7 dias de idade tanto para as aves não desafiadas como para as desafiadas com *Salmonella* Enteritidis a maior contagem foi também observada nas aves tratadas com probiótico porém apenas para o segmento de íleo. Com 21 e 35 dias de idade foi possível observar que as aves submetidas ao tratamento com probiótico pulverizado via spray foram as que tiveram maior contagem do número de células no segmento de jejuno. Sendo esse resultado também observado para o segmento de duodeno aos 35 dias de idade.

Dentro do contexto de que as células caliciformes são células secretoras de muco para a proteção da parede intestinal, justifica-se a variação na contagem do número de células caliciformes, a qual apresentou maior no segmento de duodeno das aves do tratamento controle, aos 21 e 35 dias desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. Por outro lado as aves tratadas com probiótico, independente da via de aplicação, mostraram menor número de células caliciformes, pois este atuou como agente trófico proporcionando uma maior proteção da mucosa contra patógenos.

Por fim aos 42 dias de idade novamente foi possível observar que as aves tratadas com probiótico pulverizado via spray foram as que apresentaram maior contagem do número de células caliciformes, sendo essas diferenças encontradas nos segmentos de jejuno e íleo. Poucos são os trabalhos na literatura que incluem contagem de células caliciformes e enterócitos, entretanto NUNES et al. (2009) avaliando o desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte alimentados com rações contendo aditivos alternativos a antimicrobianos não observou influencia dos tratamentos no número de células caliciformes por vilo; e LODDI, (2003) ao suplementar frangos de corte com monanooligosacarídeos, observou aumento no número de células caliciformes.

Com relação à contagem do número de enterócitos nos diferentes segmentos do intestino delgado foi possível verificar diferença ($p < 0,05$) principalmente no segmento de íleo nas diferentes fases estudadas e de duodeno aos 42 dias de idade. Embora tenha apresentado diferença dos tratamentos no número de enterócitos para esses segmentos, os valores apresentaram-se numericamente muito próximos, o que provavelmente deve ser atribuído mais ao critério de contagem do que a atuação do agente trófico.

Tabela 3 – Contagem do número de células caliciformes nos segmentos de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

SEGMENTOS	TRATAMENTOS			p
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY	
Nascimento				
DUODENO	41,20B	58,00A	50,00AB	0,018
JEJUNO	53,00AB	61,80AB	68,20A	0,035
ÍLEO	34,67B	41,33AB	49,00A	0,008
7 dias				
DUODENO	250,30	312,30	243,80	0,512
JEJUNO	276,00	241,30	216,70	0,533
ÍLEO	186,00B	229,00AB	264,80A	0,046
7 dias com desafio				
DUODENO	282,00	224,80	278,30	0,114
JEJUNO	271,00	208,00	282,20	0,114
ÍLEO	174,00B	244,70AB	356,70A	0,021
21 dias				
DUODENO	346,30	373,00	366,30	0,932
JEJUNO	319,00B	299,00B	392,00A	0,009
ÍLEO	297,00	299,50	287,80	0,878
21 dias com desafio				
DUODENO	494,30A	345,30B	301,30B	0,003
JEJUNO	406,30	394,30	342,30	0,310
ÍLEO	311,00	317,20	302,00	0,247
35 dias				
DUODENO	402,00B	375,30B	462,70A	0,019
JEJUNO	407,00B	321,00B	628,00A	0,005
ÍLEO	332,70	599,70	369,30	0,179
35 dias com desafio				
DUODENO	732,80A	386,20B	473,30B	0,018
JEJUNO	608,70	575,00	563,70	0,970
ÍLEO	470,70	428,70	469,00	0,852
42 dias				
DUODENO	366,70	341,00	418,30	0,108
JEJUNO	322,00B	417,00B	521,00A	0,012
ÍLEO	267,00B	169,00C	394,30A	0,004

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Contagem do número de enterócitos nos segmentos de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

SEGMENTOS	TRATAMENTOS			p
	CONTROLE	IN OVO	SPRAY	
Nascimento				
DUODENO	301,00	331,70	305,70	0,811
JEJUNO	231,50	206,70	215,70	0,706
ÍLEO	155,30	162,20	155,20	0,811
7 dias				
DUODENO	1328,00	1319,00	1311,00	0,309
JEJUNO	1327,00	1293,00	1256,00	0,230
ÍLEO	893,30B	952,50A	855,80C	0,005
7 dias com desafio				
DUODENO	1294,00	1319,00	1302,00	0,368
JEJUNO	1367,00	1358,00	1357,00	0,235
ÍLEO	904,80B	948,70A	902,30B	0,012
21 dias				
DUODENO	1494,00	1503,00	1512,00	0,543
JEJUNO	1532,00	1480,00	1501,00	0,102
ÍLEO	974,70	987,00	980,30	0,111
21 dias com desafio				
DUODENO	1495,00	1499,00	1464,00	0,249
JEJUNO	1488,00	1501,00	1458,00	0,137
ÍLEO	976,00A	927,30B	985,30A	0,011
35 dias				
DUODENO	1680,00	1680,00	1640,00	0,357
JEJUNO	1663,00	1626,00	1695,00	0,543
ÍLEO	984,00A	965,20B	999,00A	0,006
35 dias com desafio				
DUODENO	1731,00	1699,00	1745,00	0,619
JEJUNO	1665,00	1696,00	1656,00	0,281
ÍLEO	978,70	979,70	992,00	0,187
42 dias				
DUODENO	1772,00B	1783,00B	1840,00A	0,024
JEJUNO	1746,00	1724,00	1733,00	0,527
ÍLEO	1020,00	1026,00	1058,00	0,249

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

2 Avaliação ultraestrutural da integridade entérica

As avaliações da integridade da mucosa cecal de frangos de corte através da microscopia eletrônica de varredura em diferentes fases de criação, desafiadas ou não com *Salmonella* Enteritidis, estão apresentadas nas Figuras 1 a 8.

Ao avaliar o segmento do intestino grosso coletado, o ceco, através da microscopia eletrônica de varredura, ao nascimento, 7, 21, 35 e 42 dias de idade, foi possível visualizar somente a presença de criptas. Segundo BOLELI et al. (2002), no ceco de frangos de corte as vilosidades reduzem de tamanho desde sua base até desaparecerem no ápice. Portanto, a maior extensão da mucosa do ceco está constituída essencialmente por longas glândulas tubulares simples não ramificadas, as chamadas glândulas de Lieberkühn ou criptas.

Ao nascimento, embora ainda não estivesse estabelecido o padrão da superfície da mucosa cecal caracterizada apenas pela presença de criptas, foi possível verificar que a estrutura cecal se apresentava com pregas longitudinais nas quais se observava evaginações. Assim, os tratamentos com probiótico, independente da via de aplicação mostraram a superfície da mucosa cecal mais desenvolvida quando comparada com a superfície da mucosa cecal do tratamento controle, ou seja, as formações das criptas da mucosa das aves tratadas apresentavam-se em estágio mais avançado, caracterizado pela presença de evaginações as quais se apresentavam de forma concêntrica ao redor de uma fenda, levando a inferir a existência de maior superfície de contato, o que proporciona maior absorção.

Outra característica observada na mucosa cecal das aves tratadas com probiótico inoculado *in ovo* foi o aumento da extrusão celular o que mostrou que houve intensificação do *turnover* celular (renovação celular) quando comparado aos demais tratamentos, sugerindo que isso ocorreu devido a essas aves terem recebido o tratamento no 18^o dia de incubação. Também foi possível verificar que as aves tratadas com probiótico independente da via de aplicação apresentaram a colonização por agentes tróficos na mucosa cecal mais precocemente quando comparado à mucosa cecal das aves controle (Figura 1).

Aos 7 dias de idade, onde já foi possível observar a formação das criptas, a mucosa das aves submetidas aos tratamentos mostraram o contorno de sua abertura mais definido e arredondado quando comparado a mucosa cecal das aves submetidas ao tratamento controle, contribuindo assim para melhor estabelecimento da estrutura cecal.

Com relação ao processo de extrusão celular, foi possível verificar aumento desse processo na mucosa das aves que receberam probiótico pulverizado via spray, fato esse que pode ser justificado pelo tempo de ação do agente trófico, ou seja, a mucosa das aves ao nascimento que receberam probiótico inoculado *in ovo*, já estava sob a ação do agente trófico, enquanto que essa mesma atuação na mucosa das aves que receberam probiótico pulverizado via spray ao nascimento só foi observada aos 7 dias de idade.

Outro resultado importante está relacionado com a intensa colonização da mucosa cecal com o agente trófico, mostrando o mesmo padrão da mucosa das aves ao nascimento nas quais se evidenciou maior colonização na mucosa das aves tratadas com probióticos, sendo essa colonização mais intensa na mucosa cecal das aves que receberam probiótico inoculado *in ovo* (Figura 2).

Nessa mesma fase de criação a mucosa das aves que foram submetidas ao desafio com *Salmonella* Enteritidis foi possível verificar que aquelas que foram tratadas com probiótico pulverizado via spray, mostraram estrutura da mucosa mais íntegra quando comparado aos demais tratamentos. A colonização foi verificada em todos os tratamentos, entretanto quando isso foi observado no tratamento controle, pode-se inferir que estes bastonetes estavam relacionados com a colonização por *Salmonella* spp., uma vez que este grupo não recebeu probiótico (Figura 3).

Estudos recentes realizados sobre a morfologia dos cecos de pintos de corte submetidos ao tratamento com microbiota cecal antes e após infecção por *Salmonella* Enteritidis, verificaram que no 7º dia após tratamento, em ambos os sexos, pintos não infectados com *Salmonella* Enteritidis e os tratados com suspensão bacteriana de exclusão competitiva antes da infecção apresentaram pregas cecais longitudinais com evaginações evidentes da mucosa em sua superfície, enquanto que os pintos infectados e os tratados com suspensão bacteriana de exclusão competitiva após a infecção apresentaram pregas cecais ainda mais largas e sem as evaginações (STERZO, 2011).

Aos 21 e 35 dias de idade, para as aves de ambos os experimentos (com e sem desafio com *Salmonella* Enteritidis), observou-se que a mucosa cecal das aves tratadas com probiótico independente da via de aplicação, mostraram-se com as criptas mais definidas e preservadas quando comparada com a mucosa cecal das aves do tratamento controle, embora aos 35 dias de idade a mucosa cecal das aves de campo tratadas com probiótico *in ovo* tenham apresentado uma ligeira melhora

quando comparado com a mucosa cecal das aves tratadas com probiótico pulverizado via spray.

Com relação à colonização aos 21 e 35 dias de idade das aves criadas a campo, não foi possível verificar predomínio de colonização em nenhuma das mucosas cecais, podendo apenas inferir que na mucosa cecal das aves do tratamento controle a presença de bactérias tenha sido devido ao estabelecimento de colonização natural. Já para as aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, houve ligeiro aumento da colonização na mucosa cecal das aves que receberam probiótico inoculado *in ovo*, enquanto a presença dos bastonetes na mucosa cecal do tratamento controle pode ser oriunda do desafio feito ao 3º dia de idade com *Salmonella* Enteritidis (Figura 4 a 7).

Na fase final de criação, aos 42 dias de idade, ficou mais evidente que o tratamento com probiótico inoculado *in ovo* mostrou melhor integridade das criptas quando comparada com a integridade das criptas dos demais tratamentos, sendo que as criptas do tratamento controle apresentaram seus contornos extremamente irregulares, bem como os espaços entre as mesmas ampliados. Foi também possível observar que as criptas da mucosa das aves que receberam probiótico pulverizado via spray, apresentaram uma fusão dos seus limites e o contorno das aberturas das criptas disformes e ampliados. A colonização da mucosa como já havia sido observado nas demais idades, se manteve nos tratamentos com probiótico, sendo que a mucosa cecal das aves que foram submetidas ao tratamento com probiótico *in ovo* apresentaram um ligeiro aumento dessa colonização. Além disso, nessa idade também se observou uma colonização natural na mucosa cecal das aves do tratamento controle (Figura 8).

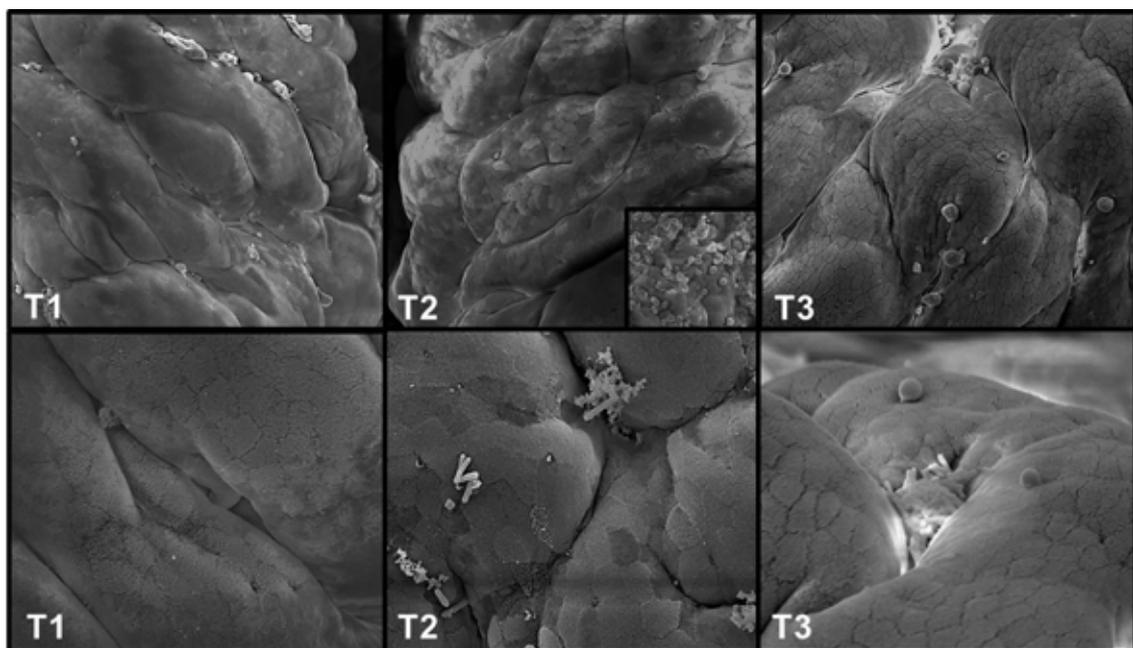


Figura 1 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte com 1 dia de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 1600X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

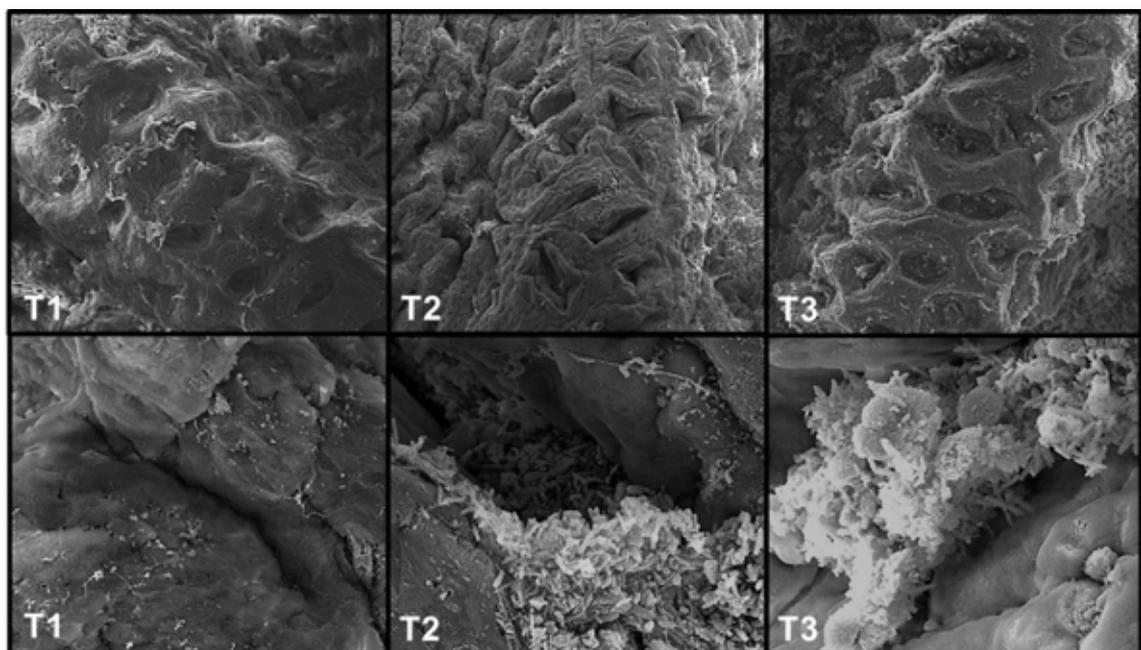


Figura 2 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 7 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

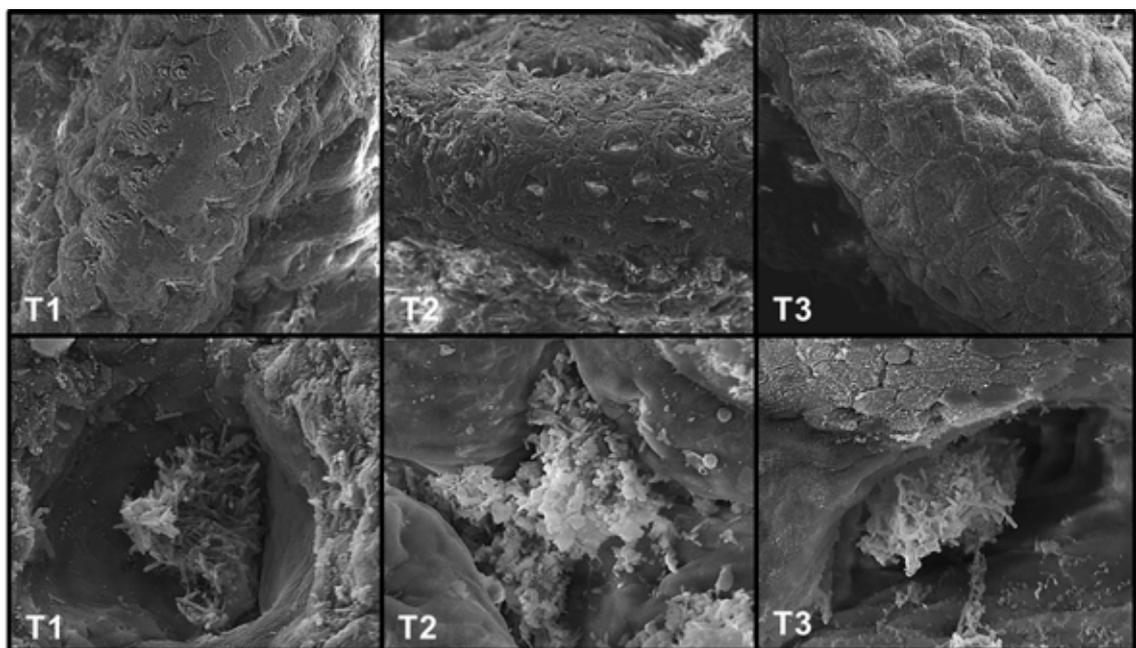


Figura 3 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 7 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

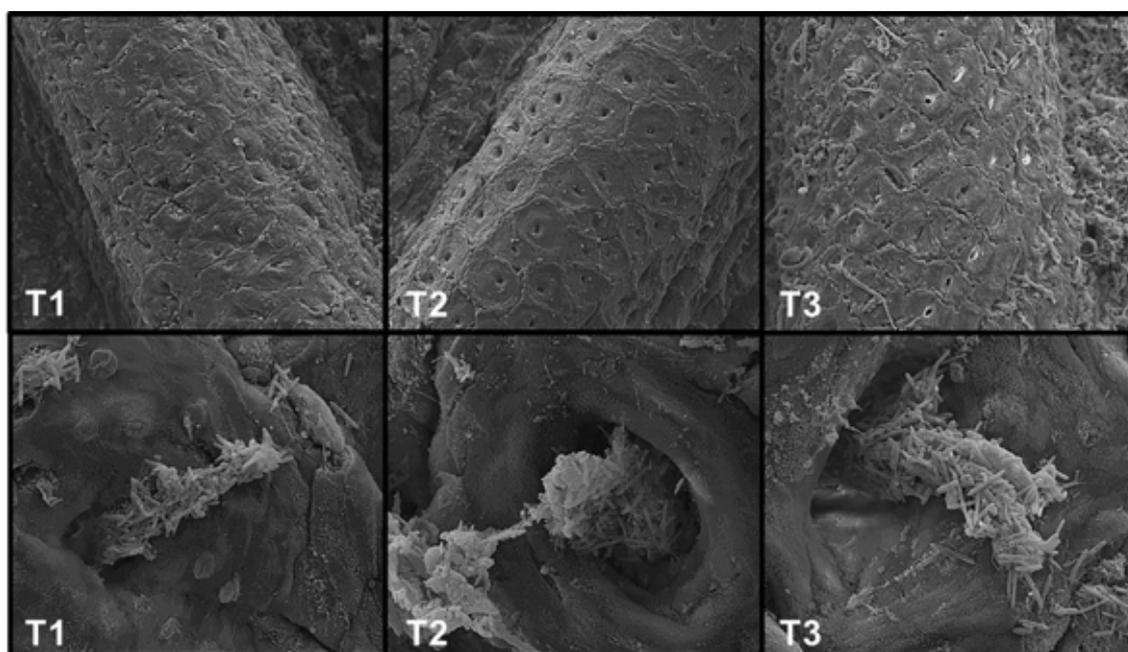


Figura 4 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 21 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

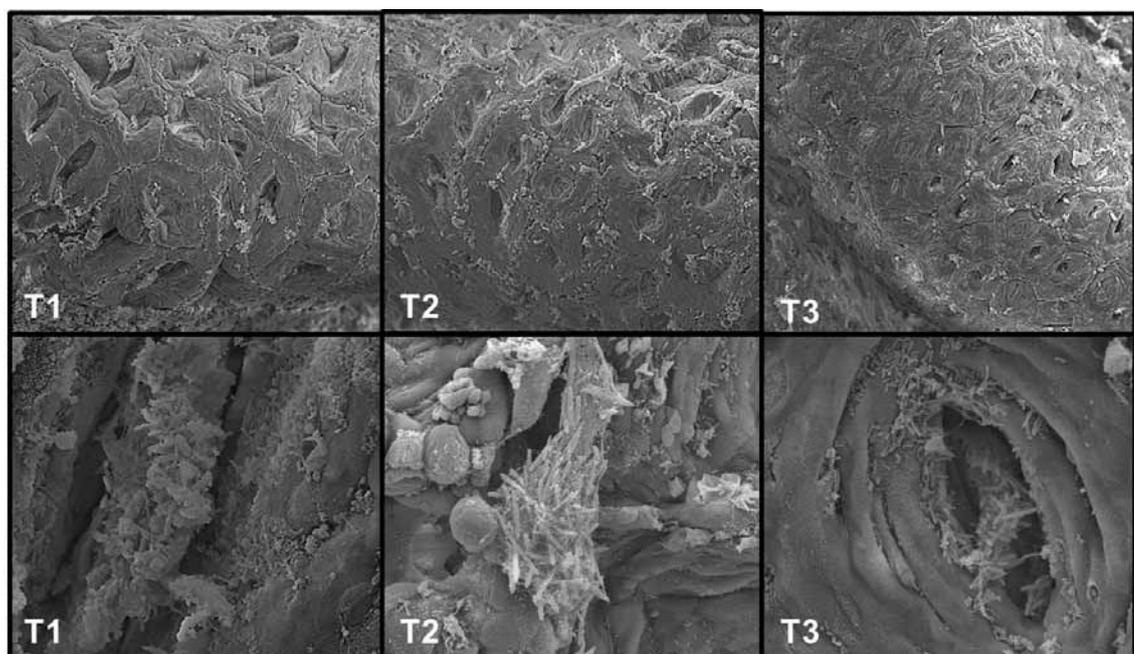


Figura 5 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 21 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

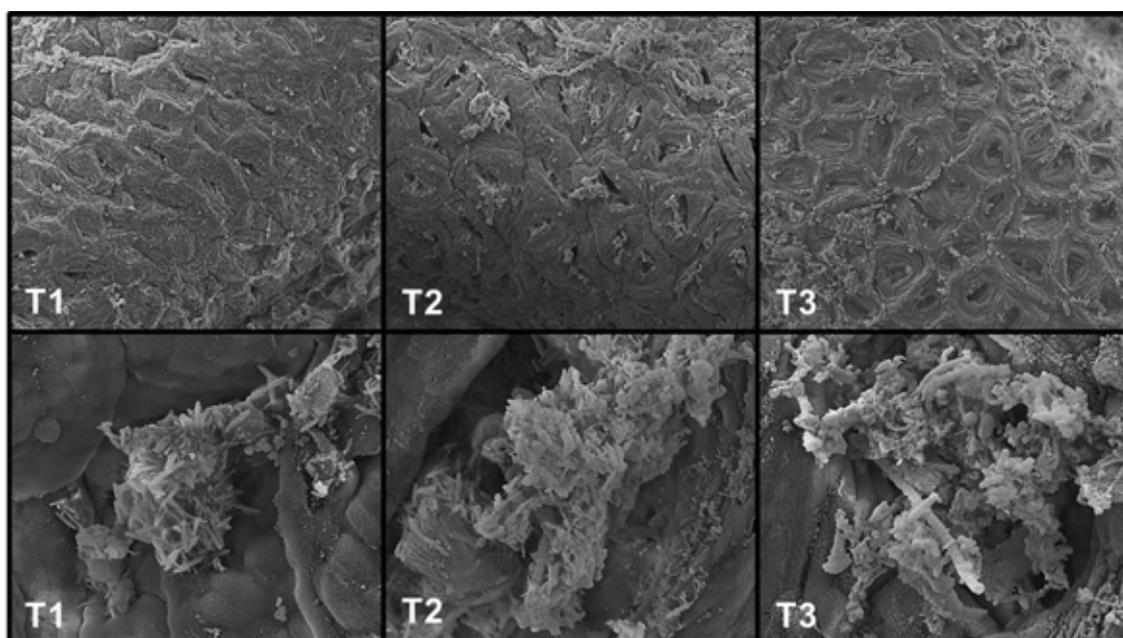


Figura 6 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 35 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

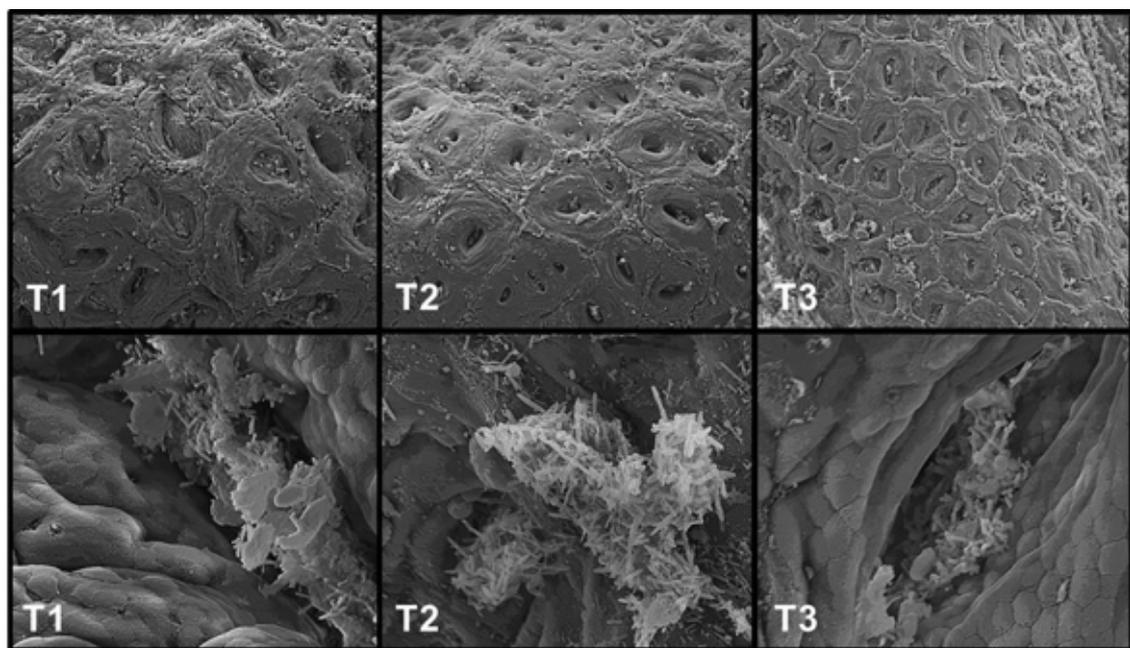


Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 35 dias de idade desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

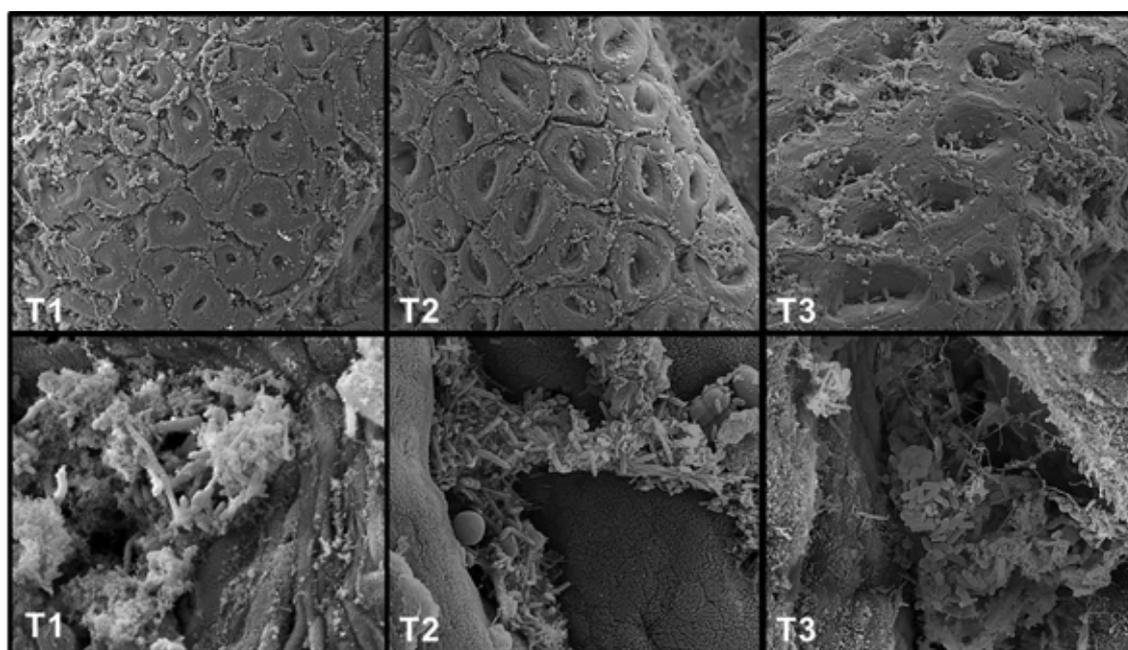


Figura 8 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 42 dias de idade. Tratamentos: T1: controle; T2: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T3: probiótico pulverizado via spray no nascimento. Linha 1: Superfície da mucosa cecal nos diferentes tratamentos. 400X. Linha 2: Detalhe evidenciando a colonização por agente trófico nos diferentes tratamentos. 5000X.

3 Avaliação microbiológica do conteúdo cecal

A avaliação microbiológica do conteúdo cecal apresentou resultados apenas aos 7 dias de idade, sendo que para as demais idades (21 e 35 dias), a contagem do número de *Salmonella* spp. (UFC/mL) foi inferior ao limite mínimo de $< 1,0 \times 10^2$ UFC/mL. Aos 7 dias de idade foi possível verificar que o tratamento com probiótico pulverizado via spray apresentou a menor contagem para *Salmonella* spp. quando comparado com os demais tratamentos. Foi também possível observar que o tratamento com probiótico inoculado *in ovo* não diferiu estatisticamente do tratamento controle, embora a contagem de *Salmonella* spp. no conteúdo cecal das aves submetidas ao tratamento com probiótico aplicado *in ovo* tenha apresentado uma redução média de 93,7% de *Salmonella* Enteritidis com a utilização de probióticos, comprovando a eficácia do probiótico utilizado na redução da colonização do trato gastrointestinal por *Salmonella* Enteritidis (Tabela 5).

Esses resultados eram esperados devido a vários fatores, idade: a contaminação aparece maior em aves mais jovens, uma vez que o sistema imunológico das mesmas ainda estava imaturo; intervalo entre o desafio e período da análise microbiológica: quanto maior esse intervalo, maior foi o tempo para que as aves pudessem reagir ao agente patogênico reduzindo assim a contaminação, resultando em um menor número de UFC/mL; intervalo entre a aplicação do probiótico e exposição ao patógeno: o que levou a inferir que as aves que receberam o probiótico via pulverização em spray ao nascimento, contavam com maior proximidade do probiótico quando comparado com as aves que os receberam inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; e o último fator a ser considerado é a concentração da dose de inoculação de *Salmonella* Enteritidis por UFC/mL: quanto maior a dosagem administrada mais tempo as aves levam para eliminar o agente patogênico, consequentemente análises da microbiologia do conteúdo cecal permaneceriam com altos índices de contaminação por mais tempo (HIGGINS et al., 2010).

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os encontrados por VICENTE et al. (2008) que avaliaram um probiótico de cultura definida (Floramax®B11) administrado de forma líquida e liofilizada via água de bebida durante três dias consecutivos (1 a 3 dias de idade), e desafiaram as aves com 10^4 UFC/ave de *Salmonella* Enteritidis 1 hora antes do início do tratamento, observaram que houve redução significativa da colonização de *Salmonella* Enteritidis em aves jovens.

Por outro lado, esses mesmos resultados diferem dos encontrados por LOURENÇO et al. (2013) em estudo que visou avaliar o uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte, verificaram que aos 7 dias de idade as amostras do conteúdo cecal e papos analisados foram negativas para *Salmonella* sp.

Os resultados do ensaio microbiológico, para pesquisa de *Salmonella* Enteritidis aos 21 e 35 dias de idade mostraram contagem inferior ao limite mínimo de contaminação por *Salmonella* sp. (UFC/mL). Os resultados deste estudo diferiram do trabalho realizado por LEANDRO et al. (2010) com probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados, os quais verificaram que o probiótico (*Bacillus subtilis*) na ração em pintos desafiados com *Salmonella* Enteritidis no primeiro dia de vida, proporcionou redução cecal da *Salmonella* Enteritidis, a partir da segunda semana de vida. Nesse mesmo estudo, os resultados microbiológicos para pesquisa de *Salmonella* Enteritidis mostraram a presença de *Salmonella*, aos 7 e 21 dias de idade, sendo que foi identificada somente nos pintos desafiados e não inoculados com o probiótico (papo e ceco); e os pintos desafiados com *Salmonella* Enteritidis, que receberam probiótico, não apresentaram a *Salmonella*. Esses resultados sugerem que as bactérias probióticas na dose de 10^6 UFC/g por ovo evitaram a colonização do trato gastrointestinal das aves por *Salmonella* Enteritidis, inoculada via papo em $1,36 \times 10^6$ UFC/ave.

Estudos realizados com probióticos de culturas definidas e indefinidas no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte por CARVALHO (2012), demonstraram que somente os probióticos de cultura definida, forma liofilizada, 7 cepas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* e o probiótico de cultura indefinida, forma liofilizada, microflora intestinal de aves SPF (Specific Pathogen Free) apresentaram contagens de *Salmonella* Enteritidis menores que o controle aos 31 dias de idade, sendo que no presente trabalho de maneira contrária, aos 35 dias de idade não houve diferença na contagem no número de *Salmonella* spp. entre os tratamentos.

OKAMOTO et al. (2009) ao realizar estudo sobre a histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis, no 3º e no 21º dias de vida, demonstraram que as aves desse grupo apresentaram lesões mais acentuadas, e

concluíram que houve pouca ação dos *Lactobacillus* spp., contra a *Salmonella* Enteritidis, independente do tratamento.

Estudos recentes sobre a avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos, na ração e na água, mostraram que diminuíram a excreção de *Salmonella* no papo e no ceco aos 21 dias de idade (PICKLER et al., 2012), sendo os resultados do presente trabalho divergentes aos encontrados por esses autores.

Tabela 5 - Contagens de *Salmonella* spp. (UFC/g) aos 7 dias de idade em conteúdo cecal de frangos de corte desafiados via intraesofágica ao 3º dia de idade por *Salmonella* Enteritidis.

TRATAMENTOS	<i>Salmonella</i> spp. UFC/g
CONTROLE	2,8 x 10 ⁶ A
IN OVO	1,6 x 10 ⁵ A
SPRAY	<1,0 x 10 ² B

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Conclusão

A utilização de probiótico melhorou a integridade da mucosa cecal de frangos de corte nas diferentes fases de criação, e mostrou maior eficácia em estabelecer microbiota protetora no controle de *Salmonella* Enteritidis aos 7 dias de idade.

Referências

- ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; MENCONI, A.; ROCHA, T.S.; GONÇALVES, G.A.M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 116, n. 1, p. 190-194, 2009.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; BALEN, L. Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênica e apatogênica de *Escherichia coli* em galinha. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, p.475-486, 1993.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2.ed. Barueri: Editora Manole, p.331, 2003.
- BERCHIERI, A.; BARROW, P.A. O desenvolvimento da microbiota intestinal em pintos de corte: prós e contras. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. Simpósio Internacional sobre manejo de pintos de corte. 1998, Santos. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.183-190, 1998.
- BOARO, M. Morfofisiologia do trato intestinal. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Facta: Campinas, p.262-274, 2009.
- BOLELI, O.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funesp. Cap.5, p.75-95, 2002.
- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003.
- CARVALHO, E. H. Probióticos de culturas definidas e indefinidas no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte. Dissertação (Mestrado) - Universidade

Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Dois Vizinhos, 82 f. 2012.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de Exclusão Competitiva. In: 5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição. **Anais...** Balneário Camboriú, p.6-28, 2004.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; WOLFENDEN, A.D.; HENDERSON, S.N.; TORRES-RODRIGUEZ A.; VICENTE, J.L.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**. 89:243-247, 2010.

LEANDRO, N.S.M.; OLIVEIRA, A.S.C.; GONZALES, E.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H.; ANDRADE, M.A. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados. Desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1509-1516, 2010.

LODDI, M.M. Probióticos, prebióticos e acidificante orgânico em dietas para frangos de corte [tese]. Jaboticabal: FCAV, UNESP; 2003.

LOURENÇO, M.C.; KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; MIGLINO, L.B.; PICKLER, L.; KRAIESKI, A.L.; SANTIN, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 33(1):11-14, 2013.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2ª ed. FUNEP/FAPESP. Jaboticabal. p.375, 2002.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S.M.; ALMEIDA, J.G.; MACARI, M. Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3 n.1 Campinas Jan./Apr. 2001.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. **Anais...** Chapecó, p. 26-41, 2004,

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. – Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2003.

MEZALIRA, T.S.; OTUTUMI, L.K.; PIAU Jr. R.; AMARAL, P.F.G.P.; SUENAGA, S.S. Morfometria do intestino delgado de frangos de corte recebendo dietas suplementadas ou não com probiótico e/ou prebiótico. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 2012246, 2014.

MINITAB® Statistical Software [computer program], version 16. State College, PA: **Minitab Inc**, 2010.

MURAROLLI, V.D.A. **Efeito da prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga-2008.

NIR, I.; SHEFET, G.; NITSAN, Z. Effect of grain particle size performance. 2. Grain texture interactions. **Poultry Science**, v.73, p.781-791, 1993.

NUNES, A.D.; VAZ A.C.N.; RASPANTINI, L.E.; SILVA, E.M.; ALBUQUERQUE, R. Desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte alimentados com rações contendo aditivos alternativos a antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.46, n.6, p.500-506, 2009.

NUNES, J.K.; GONÇALVES, F.M.; DALLMANN, H.M.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F.; MAIER, J.C.; SILVA, J.G.C. da. Desenvolvimento do sistema digestório de frangos de corte alimentados com farinha de batata doce. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.232, p.1105-1114, 2011.

OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; e NOUJAIM, J.C. Histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus* spp. e

desafiadas com *Salmonella entérica*, subespécie *entérica*, sorotipo Enteritidis. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 2, p. 568-573, abr./jun. 2009.

OLIVEIRA, M.D.; ZAVARIZE, K.C.; GOMES, N.A.; ROCHA, F.R.T.; MARTINS, J.M.S.; LITZ, F.H.; CASTILHANO, H. Aditivos alternativos na alimentação de aves. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 27, Ed. 214, Art. 1425, 2012.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. Morfometria e Ultra-Estrutura da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte alimentados com Dietas contendo diferentes Probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. V.98, n.547, p.125-134, 2003.

PICKLER, L., R. M. HAYASHI, M. C. LOURENÇO, L. B. MIGLINO, L. F. CARON, B. C. B. BEIRÃO, A. V. F. SILVA, AND E. SANTIN. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(1):27-36, 2012.

RAMOS, L.S.N.; LOPES, J.B.; SILVA, S.M.M.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, 2011.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa-MG: UFV, p.252, 2011.

Statistical Analysis System. **SAS User's Guide**: Verson 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.

STERZO, E.V. **Morfologia dos cecos de pintos de corte submetidos ao tratamento com microbiota cecal antes e após infecção por *Salmonella* Enteritidis**. 2011. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de

ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 2011.

VICENTE, J., A. TORRES-RODRIGUEZ, S. HIGGINS, C. PIXLEY, G. TELLEZ, A. M. DONOGHUE, AND B. M. HARGIS. Effect of a selected *Lactobacillus* spp-based probiotic on *Salmonella* Enteritidis-infected broiler chicks. *Avian Diseases*. 52:143–146, 2008.

WEINACK, O.M.; SNOEYENBOS, G.H.; SMYSER, C.F.; SOERJADI-LIEM, A.S. Reciprocal competitive exclusion of *Salmonella* and *Escherichia coli* by native intestinal microflora of the chicken and turkey. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.26, n.3, p.585-595, 1982.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

Implicações

Os resultados mostraram que a utilização de probiótico no presente estudo promoveu melhor conversão alimentar na fase pré-inicial, além de reduzir a contaminação por *Salmonella* Enteritidis no mesmo período e mostrou maior preservação da integridade da mucosa entérica.

A integridade do trato gastrointestinal das aves está associada ao melhor desempenho zootécnico e maior rentabilidade. Assim o entendimento da anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal de frangos de corte se reveste de grande importância, pois dentro do contexto de criação comercial destas aves que estão submetidas a altas densidades e em condições de chão, com pouco espaço para mobilidade sendo que esse sistema está constantemente sendo desafiado pela presença de bactérias patogênicas. Devido a essas condições, a saúde intestinal vem recebendo muita atenção dos pesquisadores, pois após a eclosão o trato gastrointestinal das aves, apresenta mudanças morfológicas e fisiológicas que são responsáveis pelo aumento na área de superfície de digestão e de absorção, permitindo a maturação da mucosa intestinal. Portanto controlar o ambiente intestinal e reduzir os desafios infecciosos sempre foi uma das metas da produção avícola.

A utilização de probióticos abre novas perspectivas de pesquisa para elucidar os aspectos da integridade do trato gastrointestinal, pois se sabe que este em equilíbrio e íntegro consegue de forma mais eficiente absorver nutrientes e impedir a fixação e multiplicação de agentes patogênicos na mucosa intestinal, prevenindo desta forma à instalação de doenças entéricas e conseqüentemente melhorando o desempenho, diminuindo a mortalidade e a contaminação dos produtos de origem animal.