UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE JABOTICABAL

ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FUNCIONAIS

Juan Carlos Ríos Alva
Zootecnista

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Fevereiro-2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE JABOTICABAL

ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FUNCIONAIS

Juan Carlos Ríos Alva

Orientadora: Profa. Drª. Silvana Martinez Baraldi Artoni

Coorientador: Dr. Edgar Orlando Oviedo-Rondón

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro-2014

Ríos-Alva, Juan Carlos

R586a Aditivos na alimentação de frangos de corte: desempenho, características morfométricas e funcionais / Juan Carlos Ríos Alva. – – Jaboticabal, 2014.

xix, 81 p. ; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientadora: Silva Martinez Baraldi Artoni

Coorientador: Edgar Orlando Oviedo-Rondón

Banca examinadora: Otto Mack Junqueira, Lizandra Amoroso, Ricardo de Albuquerque, Edivaldo Antônio Garcia.

Bibliografia

1. ácido orgânico. 2. antibiótico. 3. células caliciformes. 4. enzimas pancreáticas. 5. probióticos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636:087.636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Juan Carlos Ríos Alva – Filho de Carmen Alva Zavaleta e Arturo Raúl Ríos Cox. Nascido em Trujillo - La Libertad, Peru, no dia 11 de agosto de 1980. Em julho de 2000 ingressou no curso de Zootecnia na Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima-Peru), graduando-se em julho de 2005. Em março de 2007 foi selecionado para o curso de Gestão Empresarial Agrícola na mesma universidade, onde concluiu em julho de 2007. Em março de 2008 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na área de Nutrição e Alimentação Animal na linha de pesquisa Exigências Nutricionais de Animais, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal-SP, adquirindo o título de mestre em fevereiro de 2010. Em março de 2010, ingressou no Doutorado no mesmo programa, tendo realizado com a bolsa "Ciências sem fronteiras" durante 8,5 meses no ano de 2013 na North Carolina University, Raleigh, NC, USA, sob orientação do Dr. Edgar Orlando Oviedo-Rondón. No Brasil, defendeu sua tese de Doutorado no 6 de fevereiro de 2014.

DEDICATORIA

DEDICO:

A minha mãe:

CARMEN INÉS ALVA ZAVALETA, por me dar a vida, liberdade e acreditar em mim, na certeza que seu coração está repleto de alegria e orgulho;

Ao meu pai:

RAÚL RIOS COX (in memoriam), minha eterna saudade;

Agradeço-os por terem sempre mostrado que, por detrás de cada obstáculo, descubro novos horizontes;

Aos meus irmãos:

SUSSAN e EDUARDO RIOS ALVA

Quando a pessoa tem um monte de boas qualidades e é uma pessoa que eu amo muito. Eu fico sem palavras, porque nenhuma palavra descreve o quanto eu amo vocês irmãos;

ARTURO, KIKO e LESLI RIOS PRADO:

Por fazerem parte da minha vida;

Familiares:

BEATRIZ e DANIEL FLORES

Minha segunda mãe e irmão

DEDICATORIA

A minha orientadora:

Profª. Drª**. Silvana Martinez Baraldi Artoni**,

pelos ensinamentos e dedicação,

além da transmissão de suas experiências e apoio

às minhas dificuldades e sobre todo pela sua confiança e paciência.

Aos professores que fizeram parte da minha banca:

Otto Mack Junqueira

Lizandra Amoroso

Ricardo de Albuquerque

Edivaldo Garcia

pelas valiosas contribuições e

sugestões neste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A DEUS, por me permitir ter uma das épocas mais alegres da minha vida junto a minha mãe e EDÚ.

Há muitas pessoas que influenciaram minha pesquisa, trabalho, bem como a vida pessoal durante estes últimos anos. Não é possível citar todos eles aqui, mas eu sou grato por toda a ajuda e apoio.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e o Programa "Ciências sem fronteiras" pelas bolsas concedidas.

À NC STATE UNIVERSITY, NCSU, pela experiência internacional.

Aos funcionários do PRESTAGE POULTRY SCIENCE na NCSU, LYNN, VICKY, DEBBIE, DANNICA, etc.

Ao Dr. EDGAR ORLANDO OVIEDO-RONDÓN, que forneceu orientação tão necessária na realização da tese e me demonstrar e transmitir sua competência professional.

À Dra. CONSUELO ARELLANO, por sua ampla paciência, conselhos e amizade.

Aos meus amigos, CARLOS, MANUEL, ALBARAA, GANG, **JENNA**, CATHERINE, SARA, SYMPHONY, DEBRA, CAROLINA, ANDREW'S, ABDOULLAH, ALEX, por formar um excelente grupo de trabalho, sua amizade e as lições de inglês.

JEFFREY, SIMBA, DILLON, meus roommates, obrigado por me suportar e amizade.

Aos meus avôs: ARTURO e CELINDA COX BRUZULIER; BERTITA e SANTIAGO ALVA, que por sua tolerância, valores, compreensão tornaram-me o que agora sou.

Aos meus tios: TOÑO e SANTIAGO ALVA ZAVALETA, por se encontrarem sempre ao meu lado, mesmo distantes, nos ensinamentos deixados na minha formação pessoal.

A meu tio PRÓSPERO ALVA e FAMILIA, por abrir seus braços e coração, fico com muita gratidão.

Às minhas tias: MARUJA, MAGALY e SILVIA ALVA ZAVALETA, pelo aconchego, pelo carinho. Vocês são meus suportes mesmo à distância.

O engenheiro OSCAR BRICEÑO PÉREZ, pela amizade e valiosa ajuda pessoal é intelectual.

A todos meus primos (NILO, PEPO, LUZ, MISAEL, MARIO, TULA, HANS, HANIEL, ROSA, KARIN, VICTOR, FRANCO, FELIX, LUIS, ESTEFANO, ALBERTO, SHESIRA, ANGIE, ADONI, etc.).

Aos meus sobrinhos, LESLITA, DIEGO, ADRIAN, **RACHEL**, ISIS.

A o grupo de trabalho: SARA, LILIANA, ELAINE, THAYS, GIULIANA, FLÁVIA, DIANA, LIZANDRA, etc., pela colaboração e ajuda incondicional mesmo tendo muito trabalho ter correspondido da melhor forma na realização deste estudo.

Aos meus amigos da República Filomena (NIKITA, DOLLY, TOCO, URSO, TUNICO, COLT, BARBANTE, SANITARIO, GELEIA, TANSO, STREP, URSULINO, SO-DÁ, JASPION, MIÔLO, CABRITO (REGIS), MACUMBINHA, MALAKIAS, ANGÉLICA, IZAURA, REBOLAXION, APOTEOSE, CEDEN, ESCOLEO-Z, FELPUDO, UMPA LUMPA, BOÇA, PORTUGUÊS, UELINTUM, etc.), que me deram muita convivência entre brigas e abraços, risadas e choros, estudos e festas.

Aos meus amigos: ALBERTO ARTEAGA, VÍCTOR GELDRES, HUGO CABRERA, EDERIC SÁNCHEZ, NADIA ROJAS, SANDRA VILLEGAS e NÉSTOR CASTAÑEDA, cada palavra de agradecimento seria pouco. Lembrei-me com muito carinho de vocês,

Aos funcionários: ROBSON, ISILDO, VICENTE, SANDRA, HELIO, OSVALDO, MARILDA, ORANGIR pela cooperação nas diferentes fases do experimento.

Ao Dr. LUIS SCHAEFFER, Sra. ANGÉLICA e FAMILIA fico grato por me receber na sua casa e me permitir compartir momentos alegres e agradáveis junto a vocês.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho se realizasse da melhor maneira possível.

SUMÁRIO

RESUMO.....i

SUMMARY.....iii

ÍNDICE DE TABELAS.....v

LISTA DE ABREVIAÇÕES.....ix

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....1

Introdução.....1

REVISÃO DA LITERATURA.....2

Trato gastrintestinal em aves.....2

Histomorfometria do intestino delgado.....2

Vilosidades.....3

Células caliciformes.....4

Morfometria do fígado.....4

Células de kupffer.....5

Morfometria do pâncreas.....5

Ácinos serosos.....6

Ilhotas pancreáticas (Langerhans).....6

Atividade enzimática do pâncreas.....7

Probióticos.....8

Bacillus subtilis.....8

Paenibacillus sp.....9

Probiótico GalliPro®.....10

Ácido cítrico.....10

Antibióticos.....11

REFERÊNCIAS.....11

CAPÍTULO 2- EFEITOS DO PROBIÓTICO *Paenibacillus* sp. SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL, HEPÁTICA E PANCREÁTICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PÂNCREAS EM FRANGOS DE CORTE.

RESUMO.....22

SUMMARY.....24

1. INTRODUÇÃO.....25

2. MATERIAL E MÉTODOS.....26

2.1 Aves e manejo.....26

2.2 Delineamento experimental e tratamentos.....27

2.2.1 Análise estatística.....27

2.2.1.1 Dose-resposta.....27

2.2.1.2 Análises de variância.....27

2.3 Desempenho das aves.....28

2.4 Morfometria intestinal, hepática e pancreática.....28

2.4.1 Coleta de amostras para análise do intestino delgado.....28

2.4.2 Coleta de amostras do fígado e pâncreas.....29

2.5 Atividade enzimática.....30

3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....32

4. CONCLUSÕES.....60

5. REFERÊNCIAS.....61

CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DOS PROBIÓTICOS *Paenibacillus* sp., *Bacillus subtilis*, ÁCIDO CÍTRICO e LINCOMICINA SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL, HEPÁTICA E PANCREÁTICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PÂNCREAS EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO.....71

SUMMARY.....73

1. INTRODUÇÃO.....74

2. MATERIAL E MÉTODOS.....75

2.1 Aves e manejo.....75

2.2 Delineamento experimental e tratamentos.....76

2.2.1 Análise estatística.....76

2.2.1.1 Análises de variância.....76

2.3 Desempenho das aves.....77

2.4 Morfometria intestinal, hepática e pancreática.....77

2.4.1 Coleta de amostras para análise do intestino delgado.....77

2.4.2 Coleta de amostras do fígado e pâncreas.....78

2.5 Atividade enzimática.....79

3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....80

4. CONCLUSÕES.....102

5. REFERÊNCIAS.....102

ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FUNCIONAIS

Resumo - Ácidos orgânicos e probióticos são considerados aditivos alternativos aos antibióticos promotores de crescimento (APC), e têm demonstrado contribuir no desempenho das aves e ter efeito positivo na morfometria do intestino. Dois experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito da adição de dois probióticos (*Paenibacillus* sp. e *Bacillus subtilis*) e ácido cítrico no desempenho, morfometria intestinal, hepática e pancreática e atividade de enzimas pancreáticas. Para os dois experimentos, foram utilizados 400 pintinhos machos Ross 308 distribuídos em 20 boxes com cama reutilizada e alimentados com dieta à base de milho e farelo de soja (DB) contendo salinomicina. Os cinco tratamentos utilizados no primeiro experimento foram, dieta basal sem aditivos (DB) como controle negativo, dieta DB com lincomicina como controle positivo e dietas com 30, 45 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. Os mesmos controles positivo e negativo utilizados no primeiro experimento foram usados no segundo experimento com três outros tratamentos como resultado da adição de ácido cítrico, *Paenibacillus* sp. e *Bacillus subtilis* (GalliPro®). Em ambos experimentos, ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), e conversão alimentar (CA) foram avaliados durante a fase inicial (1-21 d), crescimento (22 a 35 d), e final (36 a 42 d) e durante todo fase de criação (1 a 42 d e 1 a 49 d). Aos 14, 28 e 42 dias, amostra de intestino de uma ave por box foi coletada para avaliar o comprimento, largura e densidade das vilosidades e número de células caliciformes do duodeno, jejuno e íleo, assim como o número das células de Kupffer do fígado**,** ácinos serosos e ilhotas pancreáticas. Aos 28 e 42 dias de idade foram avaliadas a atividade da amilase, tripsina e quimotripsina do pâncreas. No primeiro experimento, os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com análise de regressão dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. e contrastes ortogonais com o controle positivo e negativo. Dados do segundo experimento foram analisados num delineamento inteiramente casualizado (DIC) com contrastes ortogonais contra o controle positivo e negativo, respectivamente. No primeiro experimento, não houve efeito ($P>0,05$) da inclusão dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. sobre GP, CR, CA e V em todas as fases avaliadas e fases inteiras de criação, exceto para a conversão alimentar que melhorou linearmente ($P<0,05$) na

fase final de criação. Não se observou diferença (*P*>0,05) entre os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. sobre o controle negativo e positivo entre os tratamentos. Na morfometria intestinal, não houve efeitos dos tratamentos no comprimento das vilosidades. No entanto, os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. aumentaram linearmente a largura das vilosidades aos 14 dias, não obstante, decresceu aos 28 dias, e a densidade dos vilos aumentou aos 28 e 42 dias de idade. Os níveis de *Paenibacillus* sp. apresentaram efeito quadrático sobre o número de células caliciformes em todas as fases de criação. A amilase pancreática foi a única enzima que apresentou efeito (*P*<0,05) sobre os níveis de *Paenibacillus* sp. aos 28 e 42 dias de idade. No segundo experimento, não houve efeitos significativos (*P*>0,05) entre os tratamentos para o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar em todas as fases avaliadas nem durante o período total de criação, exceto para conversão alimentar na fase final que foi maior (*P*<0,05) no controle positivo em relação ao controle negativo. A morfometria das vilosidades foi afetada (*P*<0,05) pelos tratamentos durante a fase inicial. Frangos de corte alimentados com dieta contendo *Paenibacillus* sp. tiveram maior largura de vilosidades que o controle positivo. O comprimento das vilosidades foi menor em aves tratadas com *Paenibacillus* sp. e ácido cítrico. Os frangos tratados com ácido cítrico tiveram maior número de células caliciformes no duodeno e jejuno aos 14 e 28 dias de idade. Os tratamentos não influenciaram (*P*>0,05) a atividade enzimática do pâncreas. Baseados nos resultados, pode-se concluir que os aditivos nutricionais avaliados não afetaram o desempenho de frangos de corte, contudo, eles influenciam na morfometria do intestino, fígado e pâncreas.

Palavras-chave: ácido orgânico, antibiótico, células caliciformes, enzimas pancreáticas e probióticos

ADDITIVE IN BROILER FEED: EFFECTS ON PERFORMANCE, MORPHOMETRIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS

Summary - Acidifiers and probiotics are considered alternative feed additives (FA) for growth promotant antibiotics, and these FA have been shown to improve broiler performance and affect gut morphometrics. Two experiments were conducted to evaluate the effects of the dietary addition of two probiotics (*Paenibacillus* sp. and *Bacillus subtilis*) and citric acid on broiler performance, intestinal, pancreatic and hepatic morphometrics and pancreatic enzyme activity. For both experiments, four hundred d-old male Ross 308 chicks were placed in 20 floor pens with reused litter and fed common corn-soybean basal diets (BD) that contained salinomycin. The five dietary treatments utilized in the first experiment resulted from using the BD without feed additives (WFA) as a negative control, adding a growth promotant antibiotic (lincomycin) as a positive control, and adding *Paenibacillus* sp. at 30, 45 and 60 ppm. The same positive and negative controls were used in the second experiment with three other dietary treatments resulting from the addition of citric acid, *Paenibacillus* sp. and *Bacillus subtilis* (GalliPro®) to the BD. In both experiments, BW, feed intake (FI) and FCR corrected for mortality were evaluated at the starter (1-21d), grower (22-35d) and finisher (36-42d) phases and the whole grow out. At 14, 28 and 42d intestinal samples of one chicken per pen were collected to evaluate villi height, density and width and goblet cells in the duodenum, jejunum and ileum. At 28 and 42d of age, pancreatic amylase, trypsin and chymotrypsin activities were evaluated. In the first experiment, data were analyzed in a CRD with regression analyses of *Paenibacillus* sp. levels and orthogonal contrasts with positive and negative controls. Data in the second experiment were analyzed in a CRD with orthogonal contrasts against the positive control. In the first experiment, no significant effects ($P>0.05$) of *Paenibacillus* sp. inclusion levels were observed on BWG, FI or FCR in all phases evaluated or the whole grow out, except for a linear ($P<0.05$) improvement of FCR in the finisher phase. No significant differences ($P>0.05$) were observed between probiotic levels and the negative and positive control groups. In gut morphometrics, no effects of treatments were detected on villi height. However, as *Paenibacillus* sp. levels increased villi width linearly decreased at 14 and 28d, and villi density increased at 28 and 42d. The *Paenibacillus* sp. levels had a quadratic effect on goblet cell numbers in all sections

and age periods assessed. Amylase activity was the only pancreatic enzyme affected (P<0.05) by *Paenibacillus* sp. levels at 28 and 42d. Results from the second experiment included that no significant effects (P>0.05) of treatments were observed on BWG, FI or FCR in all phases evaluated or the whole grow out, except that FCR in the finisher phase was better (P<0.05) in the PC than the NC. Villi morphometrics were affected (P<0.05) by treatments during the starter phase. Broilers fed diets containing *Paenibacillus* sp. had wider villi than broilers from the PC. Villi height was decreased by *Paenibacillus* sp. and citric acid. Citric acid increased the number of goblet cells in the duodenum and jejunum at 14 and 28d. Treatments did not affect (P>0.05) pancreatic enzyme activity. Based on these results, it was concluded that the FA evaluated did not impact broiler performance; however, they did influence gut, liver, and pancreatic morphometrics.

Keywords: organic acid, antibiotic, goblet cells, pancreatic enzymes and probiotic

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2- EFEITOS DO PROBIÓTICO *Paenibacillus* sp. SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL, HEPÁTICA E PANCREÁTICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PÂNCREAS EM FRANGOS DE CORTE.

Tabela 1. Composição percentual e análise calculada das rações experimentais.

Tabela 2. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte machos na fase de 1 a 21, 22 a 35 e 36 a 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 3. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), viabilidade (V) de frangos de corte machos nas fases de 1 a 42 e 1 a 49 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 4. Valores médios do comprimento do duodeno (CD), do jejum (CJ) e do íleo (CI) do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 5. Largura da vilosidade do duodeno (LD), do jejuno (LJ) e do íleo (LI) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 6. Número de vilosidades do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com diferentes níveis do probiótico *Paenibacillus* sp.

Tabela 7. Número de células caliciformes do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 8. Número de células de Kupffer do fígado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 9. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) dos ácinos serosos no pâncreas de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 10. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) das células pancreáticas (ilhotas de Langerhans) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tabela 11. Atividade de enzimas pancreáticas (µmol/min/mg proteína) aos 28 e 42 dias de idade em frangos de corte submetidos a níveis do probiótico *Paenibacillus* sp.

Tabela 12-. Atividade de enzimas pancreáticas (unidades totais micromols) aos 28 e 42 dias de idade em frangos de corte submetidos a níveis do probiótico *Paenibacillus* sp.

CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DE DOS PROBIÓTICOS (*Paenibacillus* sp., *Bacillus subtilis)*, ÁCIDO CÍTRICO e LINCOMICINA SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL, HEPÁTICA E PANCREÁTICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PÂNCREAS EM FRANGOS DE CORTE.

Tabela 1. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte machos na fase de 1 a 21, 22 a 35 e 36 a 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 2. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte machos na fase de 1 a 42 e 1 a 49 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 3. Valores médios do comprimento do duodeno (CD), do jejuno (CJ) e do íleo (CI) do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 4. Largura da vilosidade do duodeno (LD), do jejuno (LJ) e do íleo (LI) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 5. Número de vilosidades do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 6. Número de células caliciformes do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade, sumetidos a melhoradores de desempenho.

Tabela 7. Número de células de Kupffer do fígado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 8. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) dos ácinos serosos do pâncreas de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 9. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) das células pancreáticas (ilhotas de Langerhans) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tabela 10. Atividade de enzimas pancreáticas (µmol/min/mg proteína) aos 28 e 42 dias de idade em frangos de corte submetidos a melhoradores de desempenho.

Tabela 11. Atividade de enzimas pancreáticas (unidades totais micromols) aos 28 e 42 dias em frangos de corte submetidos a melhoradores de desempenho.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

A - Antibiótico

APC - Antibióticos Promotores de Crescimento

AT - Área Total

DB – Dieta Basal

°C – Graus Celsius

CA - Conversão Alimentar

CD - Comprimento das Vilosidades do Duodeno

CI - Comprimento das Vilosidades do Íleo

CJ - Comprimento das Vilosidades do Jejuno

cm - Centímetros

CMI - Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI)

CR - Consumo de Ração

CV - Coeficiente de Variação

D - Diâmetro

DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado

g - Gramas

GP - Ganho de Peso

HE - Hematoxilina e Eosina

IEP - Índice de eficiência produtiva

K – Células de Kupffer

kcal – Quilocalorias

kg – Quilogramas

L - Linear

LD - Largura das Vilosidade do Duodeno

LJ - Largura das Vilosidades do Jejuno

LI - Largura das Vilosidades do Íleo

LSD - Diferença Mínima Significativa

LSMEAN - Média dos Mínimos Quadrados

m – Metro

min - Minuto

mg - Miligramas

NA - Não Antibiótico

PE - Perímetro

P - *Paenibacillus* sp.

Q - Quadrática

t - Tonelada

µm – micrômetros

µmol - micromol

V – Viabilidade

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

O Brasil foi o maior exportador, e, terceiro maior produtor de frango de corte em nível mundial. A produção de frango de corte brasileira contribuiu com mais de 12,645 milhões de toneladas no ano de 2012 (UBABEF, 2013). Para alcançar estes resultados a indústria avícola tem se desenvolvido em várias áreas como a nutrição, genética, sanidade e ambiente. Junto com estes progressos vieram novos desafios como maiores densidades de aves por m^2, reutilização de cama e problemas de saúde (DEKICH, 1998; DUDLEY-CASH, 2001).

Os antibióticos são amplamente utilizados na produção animal com fins veterinários no controle de doenças infecciosas. Além de combater os patógenos, também melhoram o desempenho do animal (DOCIC et al., 2003). O incremento do uso de antibióticos está relacionado com a disponibilidade e preço, este último tem diminuído ao longo do tempo (R$97/t) segundo (CROMWELL, 2002). O uso prolongado de antibióticos na produção animal contribui para a seleção de micro-organismos resistentes (KHACHATOURIANS,1998; TEUBER, 1999 e HOLSTROM et al., 2003). A possibilidade dos antibióticos serem banidos como aditivos promotores de crescimento nos frangos de corte aumenta a demanda de pesquisas para determinar alternativas ao uso dessas drogas, como probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e extratos de plantas (HOUSHMAND et al., 2011; YANG et al., 2009). As respostas a esses aditivos variam amplamente de acordo com o manejo e condições ambientais. Para tornar-se uma alternativa viável, o melhorador de desempenho deve produzir os mesmos ou melhores benefícios que os antibióticos promotores de crescimento (APC).

Os probióticos são micro-organismos benéficos fornecidos na ração das aves para favorecer o equilíbrio da microbiota intestinal. Esses probióticos são bactérias naturais do intestino, as quais, após ingestão em doses efetivas, são capazes de se estabelecer ou mesmo colonizar o trato digestório e manter ou aumentar a biota natural, prevenindo a colonização de organismos patogênicos e assegurando melhor utilização dos alimentos (VANBELLE et al.,1990). Os probióticos apresentam-se não

só como substitutos, mas como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento (MACARI e FURLAN, 2005).

REVISÃO DA LITERATURA

Trato gastrintestinal em aves

Histomorfometria do intestino delgado

O trato gastrintestinal é uma estrutura complexa que atua na digestão e absorção de nutrientes como também prevê a proteção contra patógenos estranhos que entram no organismo através de fontes de alimento exógenas (BAYER et al., 1974). O intestino delgado possui função importante na digestão e absorção de nutrientes e na saúde geral das aves. O duodeno é a seção que segue caudamente a superfície direita da moela e forma uma curva fechada em forma de 'U' até a junção duodenojejunal. O jejuno é a secção que apresenta espirais frouxas ao longo da borda do mesentério e se estende até o íleo. O íleo é o segmento se estende a partir da presença dos cecos até a junção íleo cecocólica. A fisiologia do intestino varia ao longo do intestino delgado e grosso.

O alimento é digerido no lúmen do intestino delgado por enzimas pancreáticas, da parede intestinal e secreções biliares do fígado, os nutrientes são absorvidos principalmente através da mucosa (TURK, 1982). A mucosa é formada por numerosas projeções. Estas estruturas são denominadas vilosidades, cuja base apresenta invaginações chamadas de criptas (de Lieberkhun). O comprimento das vilosidades incrementa a área superficial no intestino (COATES et al., 1954). Overton e Shoup (1964) e Uni et al. (1995) observaram o tamanho das vilosidades e microvilosidades, bem como as invaginações das mesmas, Coates et al. (1954) e Izat et al. (1989), aumentam a área superficial da mucosa intestinal, o que favorece a digestão e absorção de nutrientes. Na base das vilosidades estão às criptas intestinais (de Lieberkuhn) em que há proliferação de células, que, posteriormente, migram para as vilosidades (TURK, 1982). As criptas consistem em células absortivas, caliciformes e regenerativas que atúam na regeneração das células intestinais (SOLIS et al., 2005).

As células maduras do intestino delgado ocupam a extremidade da vilosidade, enquanto que as imaturas estão na base das vilosidades, próximo às criptas. As células imaturas proliferam e migram para a extremidade das vilosidades, onde amadurecem, e depois são reabsorvidas ou descartadas para o lúmen. De um modo geral, na maioria dos animais este processo leva entre 3 a 6 dias. Essa alta taxa de proliferação e renovação é regulada pela disponibilidade de nutrientes, pela gastrina, pelo hormônio de crescimento, microbiota bacteriana e atividade neuro regulatória. No entanto, a presença do alimento através do trato gastrintestinal parece ser o principal estímulo regulatorio dessa resposta, e, que afetar os sistemas de regulação antes mencionados (WILMORE, 1997).

No revestimento da superfície externa das vilosidades estão pequenas estruturas arredondadas chamadas de células caliciformes. No interior destas células estão os grânulos de mucina. Geyra et al. (2001) mostraram que a mucina proporciona revestimento protetor da mucosa para as vilosidades, desta forma, melhora a absorção e digestão de nutrientes. As células caliciformes produzem mucopolissacarídeos que são secretados dentro de uma camada que cobre o vilo e é relacionada com a lubrificação durante a passagem do quilo (MORAN, 1985). Recentemente foi considerada à mucina uma segunda função, como fonte nutritiva para a microbiota bacteriana residente (APAJALAHTI, 2005).

Vilosidades

A superfície interior do intestino é coberta por epitélio colunar, e, exibe invaginações conhecidas como criptas de Lieberkuhn. São projeções semelhantes a dedos chamadas de vilosidades que aumentam exponencialmente a área exposta ao lúmen onde se encontra o alimento, bactérias e outros elementos. Elas podem ser cônicas, projeções semelhantes a dedos (duodeno) ou podem ser dobras semelhantes a folhas curtas, como no íleo ou reto (RAMANOFF, 1960).

Nos pintainhos o intestino apresenta a formação de cristas que começa a desenvolver com a delimitação das dobras seguida de padrões longitudinais em forma

de zigue-zague, emergindo na parede da mucosa em torno de 11-15 dias após incubação (BOHÓRQUEZ, 2011). Uma semana antes da eclosão o intestino, especialmente a camada das células do epitélio, a estrutura dos vilos do embrião sofre alteração morfológica muito rápida (BURGUESS, 1975; BLACK, 1978).

Células caliciformes

Estas células caracterizam-se pela presença de núcleo oval na região basal e por numerosos e desenvolvidos grânulos de secreção na região apical. A superfície das vilosidades é recoberta por muco produzido pelas células caliciformes. Nestas últimas, as gotículas de mucina, que consistem em proteínas altamente glicosiladas e ricas em cálcio, são os locais de armazenamento dos principais produtos de secreção.

As proteínas da mucina tem em comum alto teor de serina e treonina ligados a glicanos que podem tornar-se mais de 50% da sua massa molecular. Estas são importantes na proteção das vilosidades contra produtos químicos e micro-organismos nocivos, transportadora e seletivas e seu desenvolvimento é influenciado pelo tempo de jejum ao qual a ave recém-eclodida é submetida. Aos 20 dias de incubação a largura das vilosidades apresentavam aproximadamente 70% do total da população de vilos (UNI et al., 2003).

De acordo com o tipo de segmento do intestino delgado e da superfície da vilosidade há um número proporcional de células caliciformes. A concentração de células caliciformes por vilo no duodeno, jejuno e íleo é incrementada ligeiramente no período do 18° ao 20° dia de incubação. Depois do dia 20°, há significativo aumento na população dessas células do jejuno e íleo, o que resulta em proporcional produção de mucina (UNI et al., 2003).

Morfometria do fígado

O fígado é a maior glândula do corpo, com propriedades endócrinas e exócrina. Possui lobos direito e esquerdo que se unem na linha média. O lobo esquerdo é

normalmente menor do que o lobo direito na região de união entre os lobos os quais estão em contato dorsalmente com o esôfago, estômago glandular, baço, jejuno e duodeno, e com o testículo direito, no macho, e o ovário, na fêmea em postura. A parte cranial do estomago muscular está em contato com as faces viscerais dos lobos hepáticos. Os ductos biliares e os vasos sanguíneos penetram no fígado em uma fissura transversal da face visceral do fígado (CUNNINGHAM, 2004).

O fígado também é essencial para o armazenamento de glicogênio, desintoxicação de drogas, controle do metabolismo, regulação da síntese e transporte de colesterol, metabolismo da uréia, e secreção de uma ampla variedade de proteínas plasmáticas (ITOH et al., 2011).

Célula de Kupffer

O fígado é o único órgão que presenta um sistema imune, as células de Kupffer, que correspondem à maior população de macrófagos no organismo e as células *natural killer* hepáticas (SEKI et al., 2000). Essas células formam a maior parte do retículo endotelial ou sistema fagócito mononuclear (GANDHI, 2011). Devido à sua localização topológica nos sinusoides hepáticos, que representa a primeira linha de defesa, apresenta papel essencial não só na defesa do hospedeiro, como também nos mecanismos compensatórios para a manutenção da homesostase (NAITO et al., 2004).

Morfometria do pâncreas

O pâncreas é uma glândula finamente nodular composta de tecido exócrino (80% da massa total), dutos, vasos, nervos e tecido conjuntivo (18% da massa total) e tecido endócrino, as ilhotas pancreáticas (2% do total da massa) (GLASGOW, 2008). O pâncreas de frangos tem maior porcentagem de células exócrinas (98,5 – 99% do peso fresco) que o pâncreas dos mamíferos (80% peso fresco), e tem secreções de amilase mais ricas que os mamíferos (HARADA et al., 1982; HAZELWOOD, 1986; PUBOLS, 1991, citado por MEACHAM e JOHNSON, 2003).

A função endócrina está relacionada com a secreção de vários hormônios como insulina, fator de crescimento, angiotensinogênio e trombopoietina, enquanto a exócrina relaciona-se com a produção e secreção de bile, e tem muitas funções metabólicas como, metabolismo de aminoácidos, lipídeos e hidratos de carbono, sínteses de proteína de soro, a desintoxicação de compostos xenobióticos, regulação imune, etc., importantes para a homeostase (SI-TAYEB et al., 2010; ITOH et al., 2011).

Ácinos serosos

É a porção exócrina e produz principalmente enzimas, como a amilase, lipase, tripsina e quimotripsina. As enzimas encontram-se armazenadas e inativas no pâncreas e são ativadas após a secreção da enzima enteroquinase pelo epitélio duodenal, esta enteroquinase hidrolisa o tripsinogênio na forma ativa, a tripsina, que sua vez torna ativas outras pró-enzimas Glasgow (2008), que são transportadas para o duodeno através do ducto pancreático e estão relacionadas com a digestão.

Ilhotas pancreáticas (Langerhans)

A porção endócrina do pâncreas (ilhotas de Langerhans) produz hormônios como a insulina e glucagon que regulam os níveis de glicose no sangue. Estas ilhotas são compostas por quatro tipos de células endócrinas: as células alfa (5-20% do volume das ilhotas), que produzem glucagon, as células beta (50-80% do total do volume das ilhotas) que produzem insulina, as células PP (10-35% do volume das ilhotas) que produzem polipeptídio pancreático e as células delta (menos do 5% do volume das ilhotas) que produz somastotatina. A organização destas células dentro da ilhota segue um padrão específico, as células alfa que se localizam na periferia, as células beta que se localizam no centro (núcleo) e as células delta distribuídas na interface das células alfa e beta (GLASGOW, 2008).

Atividade enzimática do pâncreas

As enzimas desempenham papel importante na quebra de nutrientes (MURRAY et al., 2003). Enzimas digestivas são secretadas no trato gastrintestinal de animais e seres humanos principalmente do estômago, intestino delgado e intestino grosso. O pâncreas é a maior fonte de protease no sistema digestivo para a digestão e ingestão de proteínas. As principais enzimas pancreáticas são amilase, lipase e tripsina, que são responsáveis pela digestão de carboidratos, triglicéridos e polipeptídeos, respectivamente. Whitcomb e Lowe (2007) relataram que em humanos as proteases primárias são sintetizadas como pró-enzimas inativas (zymogênios) e inclui três formas de tripsina: quimotripsina A e B, proelastase, procarboxypeptidase, A1, A2, B1, B2, e outras proteases, embora a natureza exata das enzimas humanas em comparação com enzimas de origem animal não tenha sido totalmente elucidada.

A tripsina é a mais importante de todas as enzimas digestivas porque atúa na regulação das outras enzimas digestivas, é cerca de 19% da proteína no suco pancreático e a mais abundante das enzimas pancreáticas (WHITCOMB e LOWE, 2007). A quimotripsina é a segunda protease mais abundante com cerca de 9% do total da proteína do suco pancreático (WHITCOMB e LOWE, 2007). A lipoproteína lipase reside nas paredes dos capilares de muitos tecidos, sendo ativada para hidrolisar quilomícrons (formados no epitélio intestinal) e lipoproteínas de baixa densidade (produzido no fígado) em monoglicéridos, ácidos graxos livres e lipoproteínas de densidade média (ECKEL, 1989).

Em aves, as enzimas são dependentes da dieta e idade. Ikeno e Ikeno (1991), relataram a atividade da amilase tão cedo como aos seis dias de incubação. Um aumento gradual da atividade da amilase a partir de dia 17 para o dia 2 pós-nascimento foi descrito por (MARCHAIM e KULKA, 1967). NITSAN et al. (1991), observaram diminuição da atividade da amilásica do dia 5° pós-nascimento com aumento até o platô no 8° dia após o nascimento. Noy e Sklan (1995), relataram aumento gradual da amilase pancreática, lipase e tripsina de 4 a 21 dias pós-nascimento. A atividade da tripsina no pâncreas começa a diminuir durante os seis primeiros dias pós-nascimento e eleva-se gradualmente até os 21 dias de idade (NITSAN et al., 1991a). A quimotripsina apresentou maior atividade aos 2 dias de

idade e depois permanece estável (MARCHAIM e KULKA, 1967 e NITSAN et al., 1991b).

Probióticos

Os probióticos são definidos como “Uma cultura de micro-organismos vivos (principalmente *Lactobacillus ssp*.) oferecidos ao animal para garantir o estabelecimento da população de micro-organismos benéficos e patógenos”, Crawford (1979), e posteriormente, Fuller (1989), que definiu “micro-organismos vivos que, quando suplementados no alimento, afetam beneficamente ao hospedeiro, favorecendo o equilibrio intestinal”. A utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, diminuindo a proliferação de bactérias patógenas, Puupponen-Pimiä et al. (2002) principalmente por exclusão competitiva. Estas bactérias benéficas contribuem com o bom funcionamento intestino o que interfere positivamente na eficiência de utilização do alimento. Como os promotores de crescimento (antibióticos) provavelmente cairão em desuso, os probióticos têm sido alternativa eficaz, com boa aceitação pela indústria avícola.

Atualmente as espécies mais utilizadas na preparação de probióticos são: *Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus plantarum, Streptococcus thermophilus, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Bifidobacterium spp.* e *Escherichia coli.* (LUTFUL KABIR, 2009). Todas são cepas intestinais exceto *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus,* são obtidas da fermentação do iogurte, Fuller (1989), a maioria de probióticos no mercado contém *Lactobacillus* sp. por ser tolerante e estável em produtos alimentícios.

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis é não patogênico em humanos e tem sido estudado extensamente do ponto de vista genético, fisiológico e como fonte de enzimas na alimentação por muitos anos. *Bacillus subtilis* pode estimular o crescimento e

desenvolvimento de órgãos do sistema imunológico dos animais, ativar linfócitos T e B, melhorar a concentração de imunoglubulinas e o nível de anticorpos, reforçar a imunidade celular e a função imune humoral (CARUSO et al., 1993; TSENG et al., 2009 citado por ZHANG et al., 2012).

Exemplos de enzimas derivadas de *Bacillus subtilis* incluem: α-amilase, β-glucanase, hemicelulase, amilase maltogênica, protease e xilanase (PARIZA e COOK, 2010). As propriedades naturais de *B. subtilis* incluem a esporulação, o que ocorre pela privação nutricional e produção de proteases extracelulares que podem degradar a enzima de interesse. Como ambas as propriedades interferem na produção de enzimas, as cepas de *B. subtilis* foram modificadas para eliminar a esporulação e minimizar a síntese de proteases extracelulares (HARWOOD, 1992).

***Paenibacillus* sp.**

O gênero *Paenibacillus* sp. é considerado quase um *Bacillus* sp. pois deriva deste gênero, mas é filogeneticamente diferente (3 rRNA *bacilli*). Segundo Ash et al. (1993) são células Gram positivas, anaeróbias facultativas ou aeróbias estritas, classificadas no “grupo 3" no gênero *Bacillus* sp. Dentre esta reclassificação temos: *Paenibacillus macerans* (Marshall e Ohye, 1966)*, Paenibacillus amylolyticus, Paenibacillus pabuli e Paenibacillus validus* (Nakamura,1984a)*, Paenibacillus pulvifaciens* (Nakamura, 1984b)*, Paenibacillus azotofixans* (Seldin et al., 1984)*, Paenibacillus gordonae* (Pichinoty et al., 1986) *e Paenibacillus alvei, Paenibacillus larvae, Paenibacillus macerans e Paenibacillus polymyxa* (CLAUS e BERKELEY, 1986*,* referenciados por ASH et al., 1993).

Espécies de *Paenibacillus* sp. foram isoladas de outros tipos de fontes, por exemplo, água, leite, rizosferas das plantas, leveduras, alimentos, húmus, etc. (SELDIN et al., 1984, MONTEFUSCO et al., 1993, KANZAWA et al., 1995, SHIDA et al., 1997a, b; YOON et al., 1998, ELO et al., 2001, SCHELDEMAN, et al., 2004, LEE et al., 2007, MA e CHEN, 2008, LIU et al., 2010).

Probiótico GalliPro®

Bacillus subtilis cepa DSM 17299 é usado na alimentação de aves em dose mínima de $8x10^8$ e máxima de $1,6x10^9$ UFC/g (EFSA, 2010). Como aditivo, GalliPro® contém mínimo de $1,6x10^9$ esporos viáveis/g que germinam no sistema digestório das aves, produzindo altas quantidades de enzimas digestivas (proteases, amilase e lipase) no trato gastrintestinal, o que auxilia na digestibilidade dos alimentos. Esses esporos e metabólitos ajudam a manter a microbiota saudável, estimulam a produção de ácido lático pelas bactérias, minimizam as interações patogênicas com o trato gastrintestinal, e, estimulam o sistema imune, o que resulta em melhor desempenho do animal sem o uso de antibióticos. A formulação com o produto GalliPro® é resistente ao calor, apresenta efeito benéfico sobre o equilíbrio microbiano do trato gastrintestinal de frangos de corte, tornando-se facilmente incorporado em alimentos como os outros tratamentos convencionais.

Ácido cítrico

O ácido cítrico (ácido 2 hidroxipropano-1, 2, 3 tricarboxílico) foi isolado e cristalizado do suco de limão (SCHEELE, 1784). Este ácido é encontrado em diferentes cítricos, frutas, e, produzido pelo organismo humano e célula vegetal durante a fase inicial do ciclo de Krebs. Todas as leveduras, mofos e bactérias possuem dentro do seu metabolismo o ciclo dos ácidos tricarboxilicos, e algumas podem ser selecionadas pela sua habilidade de produção. Em soluções concentradas de açúcar algumas cepas do *A. niger*, tem demonstrado a capacidade de produção de grandes quantidades de ácido cítrico (CURRIE, 1917).

Uma vez que não é tóxico, tem sido usado na indústria alimentícia como agente acidificante, antioxidante e preservante. Ácidos orgânicos têm sido estudados por sua atividade microbiana específica (PATTEN e WALDROUP, 1998). O ácido cítrico é um ácido orgânico que incrementa a digestibilidade de proteína e fibras (Atapattu e Nelligaswatta, 2005), assim como reduz o pH da digesta (Radcliffe et al., 1998 e Afsharmanesh e Pourreza, 2005), melhora a utilização de fósforo (Snow et al., 2004,

Boling et al., 2000), aumenta o teor de cinzas nos ossos (Angel et al., 2001), melhora os parâmetros de desempenho (Denli et al., 2003) entre outros.

Antibióticos

Os antibióticos na alimentação são usados para prevenção de enfermidades em dosagem sub-terapêutica, e controle de patógenos quando de surtos de doenças, assim como, promotores de crescimento (APC) na alimentação animal para estabilizar a microbiota intestinal, melhorar o desempenho, aumentando a produção de carne e ovos (MILES et al., 1984; WALDROUP et al., 1985). No entanto, o uso de antibióticos na dieta pode causar diferentes problemas como a seleção de micro-organismos resistentes aos antibióticos (Sorum e Sunde, 2001), resíduos em produtos de origem animal (Burgat, 1999; Bartom, 2000 e Snel et al., 2002) e desbalanço da microbiota intestinal (VISEK, 1978; ANDREMONT, 2000; BARTON, 2000; SNEL, 2000). Esta possível resistência poderia ser transferida para patógenos em humanos (CASEWELL et al., 2003). De acordo com estas circunstâncias, o uso de antibióticos como aditivo na alimentação animal tem sido banido em alguns países o que promove interesse no uso de produtos alternativos (NISBET, 2002; PHILIPPE, 2003 e LA RAGIONE et al., 2004).

REFERÊNCIAS

AFSHARMANESH, M. and POURREZA, J. Effects of calcium, citric acid, ascorbic acid, vitamin D3 on the efficacy of microbial phytase in broiler starters fed wheat-based diets: Performance, bone mineralization and ileal digestibility. **Int. J. Poultry Sci.**, v.4, p. 418-424, 2005.

ANGEL, R.; APPLEGATE, T.J.; CHRISTMAN, M. and DHANDU, A.S. Non-phytate phosphorus sparing effect of phytase and citric acid when fed to poults. **Poult. Sci.,** v. 80 Suppl.1, p. 134. (Abstr.), 2001.

APAJALAHTI, J. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. **J. Appl. Poult. Res**., v. 14, p. 444-453, 2005.

ARAÚJO, F.J. **Diversidade bacteriana do solo em diferentes fitofisionomias do bioma cerrado e perspectivas biotecnológicas**. 2011. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Genómicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasilia, Brasilia, 2011.

ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 64, p. 253-260, 1993.

ATAPATTU, N.S.B.M.; NELLIGASWATTA, C.J. Effects of citric acid on the performance and utilization of phosphorous and crude protein in broiler chickens fed rice byproducts-based diets. **Int. J. Poult. Sci.,** v. 4, p. 990–993, 2005.

BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health**. Nutr. Res. Rev.,** v. 13. p. 279-299, 2000.

BAYER, R.C.; BIRD, F.H.; MUSGRRAVE, S.D.; CHAWAN, C.B. A simple method of preparation of gastrointestinal tract tissue for scanning electron microscopy. **J. Anim. Sci.,** v. 38, p. 354-356, 1974.

BLACK B.L.; MOOG, F. Alkaline phosphatase and maltase activity in the embryonic chick intestine in culture. Influence of thyroxine and hydrocortisone. **Dev. Biol**., v. 66, n. 1, p. 232-249, 1978.

BOHÓRQUEZ, D.V.; BOHÓRQUEZ, N.E.; FERKET, P.R. Ultrastructural development of the small intestinal mucosa in the embryo and turkey poult: a light and electron microscopy study. **Poult. Sci**., v. 90, p. 842–855, 2011.

BOLING, S.D.; WEBEL, D.M.; MAVROMICHALIS, I.; PARSONS, C.M. and BAKER, D.H. The effect of citric acid on phytate phosphorus utilization in young chicks and pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 682-689, 2000.

BURGAT, V. Residues of drugs of veterinary use in food. **Rev. prat.,** v. 41, p. 985-990, 1999.

BURGESS, D.R. Morphogenesis of intestinal villi. II. Mechanism of formation of previllous ridges. **J. Embryol. Exp. Morphol**., v. 34, n. 3, p. 723-40, 1975.

CARUSO, A.; FLAMMINIO, G.; FOLGHERA, S.; PERONI, L.; FORESTI, I.; BALSARI, A. and TURANO, A. Expression of activation markers on peripheral-blood lymphocytes following oral administration of bacillus subtilis spores. **Int. J. Immunopharmac**., v. 15, n. 2, p. 87-92, 1993.

CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILLIPS, I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **J. Antimicrob. Chemother**., v. 52, p. 159-161, 2003.

CLAUS, D. & BERKELEY, R.C.W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1986. v. 2, p. 1105-1139.

COATES, M.E.; DAVIES, M.K.; KON, S.K. The effect of antibiotics on the intestine of the chick. **Br. J. Nutr.,** v. 9, p. 110-119, 1954.

CRAWFORD, J.S. “Probiotics” in animal nutrition. In Proceedings, **Arkansas Nutrition Conference**, Arkansas, USA, September 27-28; p. 45-55, 1979.

CROMWELL, G. Why and how antibiotics are used in swine production. **Anim. Biotechnol**., v. 13, p. 7-27, 2002.

CUNNIGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária. 3ªed**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 454, 2004.

CURRIE, J.N. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. **J. Biol. Chem.,** v. 31, p. 15-37, 1917.

DEKICH, M. Broiler industry strategies for control of respiratory and enteric diseases. **Poult. Sci. J.,** v. 77, n. 8, p. 1176-80, 1998.

DENLI, M.; OKAN, F. and CELIK, K. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. **Pak. J. Nutr.,** v. 2, p. 89-91, 2003.

DOCIC, M.G.B. Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli.*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics. **J. Vet. Med.,** Série B, v. 50, p. 27-30, 2003.

DUDLEY-CASH, W. International poultry production expected to grow beyond. **Feedstuffs.,** 73, 2001.

ELO, S.; SUOMINEN, I.; KA¨MPFER, P.; JUHANOJA, J.; SALKINOJA-SALONEN, M. & HAAHTELA, K. *Paenibacillus borealis sp. nov*., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**., v. 51, p. 535–545, 2001.

ECKEL, R.H. Lipoprotein lipase, a multifunctional enzyme relevant to common metabolic disease. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. **The England Journal of Medicine,** v. 320, p.160, 1989.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 for chickens reared for laying, ducks for fattening, quails, pheasants, partridges, guinea fowl, pigeons, geese for fattening and ostriches. **EFSA Journal**, v. 9, n. 3, 2014.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GANDHI, C.H. Kupffer cells. **Molecular pathology library series**. Chapter 6. Springer, 2011.

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. **Br. J. Nutri**., v. 86, n. 1, p. 53-61, 2001.

GLASGOW, R.E.; MULVIHILL S.J. **Surgery. Basic science and clinical evidence**. Springer. New York. 875-909, 2008.

HARADA, E.; NAKAGAWA, K.; KATO, S. Characteristic secretory response of the exocrine pancreas in various mammalian and avian species. **Comp. Biochem. Physiol., v.** 73, p. 447– 453, 1982.

HARWOOD, C.R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnol**., v. 10, p. 247-256, 1992.

HAZELWOOD, R.L.; Pancreas. IN: Sturkie, P.D. (Ed.), **Avian Physiology, 4th ed**. Springer-Verlag, New York, p. 494–500, 1986.

HOLMSTROM, K.; GRASLUND, S.; WAHLSTROM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **Int. J Food Sci. and Technol.,** v. 38, p.255-266, 2003.

HOUSHMAND, M.; AZHAR, K.; ZULKIFLI, I.; BEJO, M.H. and KAMYAB, A. Effects of non antibiotic feed additives on performance, nutrient retention, gut pH, and intestinal morphology of broilers fed different levels of energy. **J. Appl. Poult. Res.,** v. 20, p. 121-128, 2011.

IKENO, T.; IKENO, K. Amylase activity increases in the yolk of fertilized-eggs during incubation in chickens**. Poult. Sci**., v. 70, p. 2176-2179, 1991.

ITOH, T.; TANAKA, M.; MIYAJIMA, A. Liver stem cells. **Regenerative Medicine**. Springer, 2011.

IZAT, A.L.; THOMAS, R.A.; ADAMS, M.H. Effects of dietary antibiotic treatment on yield of commercial broilers. **Poult. Sci.,** v. 68, p. 651-655, 1989.

KANZAWA, Y.; HARADA, A.; TAKEUCHI, M.; YOKOTA, A. & HARADA, T. *Bacillus curdlanolyticus sp. nov.* and *Bacillus kobensis sp. nov.,* which hydrolyse resistant curdlan. **Int. J. Syst. Bacteriol.,** v. 45, p. 515–521, 1995.

KHACHATOURIANS, G.G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Can. Med. Assoc. J.,** v. 159, n. 9, p. 1129, 1998.

LA RAGIONE R.M.; NARBAD, A.; GASSON, M.J; WOODWARD, M.J. In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. **Lett. Appl. Microbiol**., v. 38, n. 3, p. 197-205, 2004.

LEE, F.L.; KUO, H.P.; TAI, C.J.; YOKOTA, A. and LO, C.C. *Paenibacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from soil in Taiwan. **Int.J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 1351-1354, 2007.

LIU, Y.; LIU, L.; QIU, F.; SCHUMANN, P.; SHI, Y.; ZOU, Y.; ZHANG, X. and SONG, W. *Paenibacillus hunanensis* sp. nov., isolated from rice seeds. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 1266-1270, 2010.

LUTFUL, S.M.K. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. **Int. J. Mol. Sci***.,* v. 10, p. 3531-3546, 2009.

NAKAMURA, L.K. *Bacillus amylolyticus sp.* nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabulisp.* nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. **Int. J. Syst. Bacteriol.,** v. 34, p. 224-226, 1984a.

NAKAMURA, L.K. *Bacillus pulvifaciens sp.* nov., nom. rev. **Int. J. Syst. Bacteriol**., v. 34, p. 410-413, 1984b.

MA, Y.C. and CHEN, S.F. *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**., v. 58, p. 319-323, 2008.

MACARI, M.; FURLAN, R.L. Probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1, 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, p. 53-71, 2005.

MAHMOOD, S.; KHAN, A.M.; SAWAR, M.; NISA, M. Use of chemical treatment to reduce antinutritional effects of tannins in salseed meal: Effect on performance and digestive enzymes of broilers. **Livest. Sci.,** v. 116, p. 162-170, 2007.

MARCHAIM, U.; KULKA, R.G. The non-parallel increase of amylase chymotrypsinogen and procarboxypeptidase in the developing chick pancreas. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 146, p. 553-559, 1967.

MARSHALL, B.J. & OHYE, D.F. *Bacillus macquariensis n*. sp., a psychrotrophic bacterium from sub-antarctic soil. **J. Gen. Microbiol.,** v. 44, p. 41-46, 1966.

MEACHAMA, C.A.; JOHNSON SR., A.D. An embryonic chick pancreas organ culture model: characterization and neural control of exocrine release. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical,** v.105, p. 118–130, 2003.

MILES, R.D.; JANKY, D.M. and HARMS, R.H. Virgiamycin and broiler performance. **Poult. Sci.**, v. 63, p. 1218-1221, 1984.

MONTEFUSCO, A.; NAKAMURA, L.K. and LABEDA, D. P. *Bacillus peoriae* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 43, p. 388-390, 1993.

MORAN JR., E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and the events through perinatal development. **J. Nutr.**, v.115, p. 665-674, 1985.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; RODWELL, V.W. Harper's illustrated biochemistry. 27th ed. Lange medical books, **McGraw-Hill.** Section 1, Enzymes, 49-60, 2003.

NAITO, M.; HASEGAWA, G.; EBE, Y.; YAMAMOTO, T. Differentiation and function of Kupffer cells. **Med. Electron. Microsc.**, v. 37, n. 1, p. 16-28, 2004.

NISBET, D. Defined competitive exclusion cultures in the prevention of enteropathogen colonisation in poultry and swine. **Antonie Van Leeuwenhoek**., v. 81, p. 481-486, 2002.

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

NITSAN, Z.; DUNNIGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. **Poult. Sci.,** v. 70, p. 2040-2048, 1991.

NOY, Y.; SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poult. Sci.**, v.74, n. 2, p. 366-373, 1995.

OVERTON, J.; SHOUP, J. Fine structure of cell surface specializations in the maturing duodenal mucosa of the chick**. J. Cell Biol.**, v. 21, p. 75-82, 1964.

PARIZA, M.W.; COOK, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. **Regul. Toxicol. Pharmacol.,** v. 56, p. 332–342, 2010.

PATTEN, J.D. and WALDROUP, P.W. Use of or ganic acids in broiler diets. **Poult. Sci.,** v. 67, p. 1178–1182, 1988.

PHILIPPE, B. EU assessment of enterococci as feed additives. **Int. J. Food Microbiol**., v. 88, p. 247-254, 2003.

PICHINOTY, F.; WATERBURY, J.B.; MANDEL, M. & ASSELINEAU, J. Bacillus gordonae sp. nov., une nouvelle espèce appartenant au second groupe morphologique, dégradant divers composés aromatiques. **Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.**, v. 137A, p. 65-78, 1986.

PUBOLS, M.H. Ratio of digestive enzymes in the chick pancreas. **Poult. Sci.,** v. 70, 337– 342, 1991.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; MYLLAERINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T. and POUTANEN K. Development of functional ingredients for gut heath. **Trends in Food Sci. Technol.***,* v. 13, p. 3-11, 2002.

RADCLIFFE, J.S., ZHANG, Z. and KORNEGAY, E.T. The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soy bean meal-based diet for weanling pigs. **J. Anim. Sci.,** v. 76, p. 1880–1886, 1998.

ROMANOFF, A.L. The Avian Embryo. Structural and Functional Development. **MacMillan Co.**, New York, NY. 1960.

SCHELDEMAN, P.; GOOSSENS, K.; RODRIGUEZ-DIAZ, M.; PIL, A.; GORIS, J.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; LOGAN, N.A. and HEYNDRICKX, M. *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**., v. 54, p. 885-891, 2004.

SCHEELE, C. Sammtliche Physische and Chemische Werke. Hermbstadt, **Berlin. Crells Ann.** v. 2, n. 1, 1784.

SEKI, S.; HABU, Y.; KAWAMURA, T.; TAKEDA, K.; DOBASHI, H.; OHKAWA, T. and HIRAIDE, H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses**. Immunol. Rev.,** v. 174, p. 35-46, 2000.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. & PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. Int. **J. Syst. Bacteriol.,** v. 34, p. 451-456, 1984.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; NAKAMURA, L.K. & KOMAGATA, K. Transfer of *Bacillus alginolyticus, Bacillus chondroitinus, Bacillus curdlanolyticus, Bacillus glucanolyticus, Bacillus kobensis, and Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.,** v. 47, p. 289–298, 1997a.

SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., NAKAMURA, L.K. & KOMAGATA, K. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp*. nov.* and *Paenibacillus chibensis sp. nov.* **Int. J. Syst. Bacteriol.,** v. 47, p. 299–306, 1997b.

SI-TAYEB, K.; LEMAIGRE, F.P.; DUNCAN, S.D. Organogenesis and development of the liver. **Developmental Cell 18**, Elsevier Inc., 2010.

SOLIS, de los SANTOS, F.; FARNELL, M.B.; TELLEZ, G.; BALOG, J.M.; ANTHONY, N.B.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HIGGINS, S.; B.M.; DONOGHUE, A.M. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. **Poult. Sci.,** v. 84, p. 1092-1100, 2005.

SNEL, J.; HARMSEN, H.J.M.; VAN DER WIELEN, P.W.J.J.; WILLIAMS, B.A. Dietary strategies to influence the gastro-intestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. Pages 37–69 in Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract. BLOK, M.C.; VAHL, H.A.; DE LANGE, L.; VAN DE BRAAK, A.E.; HEMKE, G.; HESSING, M. ed. **Wageningen Academic Publishers**, the Netherlands, 2002.

SNOW, J.L.; BAKER, D.H. and PARSONS, C.M. Phytase, citric acid, and 1α-hydroxycholecalciferol improve phytate phosphorus utilization in chicks fed a corn-soybean meal diet. **Poult. Sci.,** v. 83, p. 1187-1192, 2004.

SORUM H.; SUNDE M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. **Vet. Res.,** v. 32, p. 227-241, 2001.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. CMLS, **Cell. Mol. Life Sci.,** v. 56, p. 755-763, 1999.

TSENG, D.Y.; HO, P.L.; HUANG, S.Y.; CHENG, S.C.; SHIU, Y.L.; CHIU, C.S. and LIU, C.H. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, Litopenaeus. vannamei, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish Shell-fish Immunol.,** v.26, p. 339–344, 2009.

TURK, D.E. Symposium: The avian gastrointestinal tract and digestion. The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. **Poult. Sci.,** v. 61, p. 1225-1244, 1982.

UBABEF- União Brasileira de Avicultura. Mercado interno. Disponível em **<http: http://www.abef.com.br/ubabefnovo/mercado_interno.php>**. Acesso em 11 de outubro de 2013.

UNI, Z.; NOY, Y. and SKLAN, D. Posthatch changes in morphologyand function of the small intestines in heavy- and light-strain chicks. **Poult. Sci**., v. 74, p. 1622–1629, 1995.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. Morphological, molecular and functional changes in the chicken small intestine of the late embryo. **Poult. Sci.,** v. 82, p. 1747-1754, 2003.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Arch. Anim. Nutr.** (Berlim), v.40, n.7, p. 543-567, 1990.

WALDROUP, P.W.; SPENCER, G.K.; WAIBEL, P.E.; QUARLES, C.L.; GRANT, R.J. The use of bambermycins (Flavomycin) and halofuginone (Stenerol) in diets for growing turkeys. **Poult. Sci.,** v. 64, p. 1296-1301, 1985.

WILMORE, D.W. Metabolic support of the gastrointestinal tract. Potential gut protection during intensive cytotoxic therapy. **Cancer,** v. 79, p. 1794-1803, 1997.

WHITCOMB, D.C.; LOWE, M.E. Human pancreatic digestive enzymes. **Dig. Dis. Sci.,** v. 52, p. 1-17, 2007.

ZHANG, X.; CAO, F.; SUN, Z.; YU, W.; ZHAO, L.; WANG, G.; WANG, T. Effect of feeding *Aspergillus niger*-fermented Ginkgo biloba-leaves on growth, small intestinal structure and function of broiler chicks. **Livest. Sci.,** v. 147, p. 170-180, 2012.

YANG, Y.; IJI, P.A. and CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World Poult. Sci. J.,** v. 65, p. 97-114, 2009.

YOON, J.H.; YIM, D.K.; LEE, J.S.; SHIN, K.S.; SATO, H.H.; LEE, S.T.; PARK, Y.K. and PARK, Y.H. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil. **Int. J. Syst. Bacteriol.,** v. 48, p. 833-837, 1998.

CAPÍTULO 2 - EFEITOS DO PROBIÓTICO *Paenibacillus* sp. SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL, HEPÁTICA E PANCREÁTICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PÂNCREAS EM FRANGOS DE CORTE

Resumo - Este estudo foi realizado para investigar os efeitos da adição de três níveis de *Paenibacillus* sp. na alimentação de frangos de corte sobre o desempenho e morfometria intestinal, hepática e pancreática e atividade enzimática. Foram utilizados 400 pintinhos machos Ross 308 alojados em 20 boxes com cama reutilizada e alimentados com dieta a base de milho e farelo de soja como dieta basal (DB) que continha salinomicina. Os tratamentos foram, dieta basal sem aditivos (DB) como controle negativo, dieta DB com lincomicina como controle positivo e dietas com 30, 45 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. O ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), e conversão alimentar (CA) foram avaliados durante a fase inicial (1-21 d), crescimento (22 a 35 d), e final (36 a 42 d) e durante todo fase de criação (1 a 42 d e 1 a 49 d). Aos 14, 28 e 42 dias, uma ave por box foi coletada amostra para avaliar o comprimento, largura e densidade das vilosidades e número de células caliciformes do duodeno, jejuno e íleo, assim como o número das células de Kupffer do fígado e ácinos serosos e ilhotas pancreáticas. Aos 28 e 42 dias de idade foram avaliadas a atividade da amilase, tripsina e quimotripsina do pâncreas. Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com análise de regressão dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. e contrastes ortogonais com o controle positivo e negativo. Não houve efeito (P>0,05) da inclusão dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. sobre GP, CR, CA e V em todas as fases avaliadas e fases inteiras de criação, exceto para a conversão alimentar que melhorou linearmente (P<0,05) na fase final de criação. Não se observou diferença (P>0,05) entre os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. sobre o controle negativo e positivo entre os tratamentos. Na morfometria intestinal, não houve efeitos dos tratamentos no comprimento das vilosidades. No entanto, os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. aumentaram linearmente a largura das vilosidades aos 14 dias, não obstante, decresceu aos 28 dias, sem embargo, a densidade dos vilos aumentou aos 28 e 42 dias de idade. Os níveis de *Paenibacillus* sp. apresentaram efeito quadrático sobre o número de células caliciformes em todas as fases de criação. A amilase pancreática foi a única enzima

que apresentou efeito (*P*<0,05) pelos níveis de *Paenibacillus* sp. aos 28 e 42 dias de idade.

Palavras-chave: aditivos, antibiótico, aves, células caliciformes e probiótico

EFFECTS OF *Paenibacillus* sp. ON PERFORMANCE AND GUT, LIVER AND PANCREAS MORPHOMETRIC AND PANCREATIC ENZYMES ACTIVITY ON BROILERS

Summary - Probiotics have been shown to improve broiler performance and affect gut morphometrics. This study was conducted to investigate the effects of adding three levels of *Paenibacillus* sp. to the feed of broilers on performance and intestinal, pancreatic and hepatic morphometrics. Four hundred d-old male Ross 308 chicks were placed in 20 floor pens with reused litter and fed common corn-soybean basal diets (BD) that contained salinomycin. Five dietary treatments resulted from using the BD without feed additives (WFA) as a negative control, adding growth promotant antibiotic (lincomycin) as a positive control, and adding *Paenibacillus* sp. at 30, 45 and 60 ppm. BW, feed intake (FI) and FCR corrected by mortality were evaluated at starter (1-21d), grower (22-35d) and finisher (36-42d) phases and the whole grow out. Mortality was recorded. At 14, 28 and 42d intestinal samples of one chicken per pen were collected to evaluate villi height, density and width, and goblet cells in the duodenum, jejunum and ileum. At 28 and 42d of age, pancreatic amylase, trypsin and chymotrypsin activities were evaluated. Data were analyzed in a CRD with regression analyses of *Paenibacillus* sp. levels and orthogonal contrasts with positive and negative controls. No significant effects ($P>0.05$) of *Paenibacillus* sp. inclusion levels were observed on BWG, FI or FCR in all phases evaluated or the whole grow out, except for a linear ($P<0.05$) improvement of FCR in the finisher phase. No significant differences ($P>0.05$) were observed between probiotic levels with the negative and positive control groups. In gut morphometrics, no effects of treatments were detected on villi height. However, as *Paenibacillus* sp. levels increased villi width linearly decreased at 14 and 28d, and villi density increased at 28 and 42d. The *Paenibacillus* sp. levels had a quadratic effect on goblet cell numbers in all sections and age periods assessed. Amylase activity was the only pancreatic enzyme affected ($P<0.05$) by *Paenibacillus* sp. levels at 28 and 42d. It was concluded that *Paenibacillus* sp. did not affect broiler performance; nevertheless it influenced gut, liver and pancreas morphometrics and pancreatic enzyme activity.

Keywords: aditive, antibiotic, broiler, goblet cells, and probiotic

1. INTRODUÇÃO

Tratamentos com antibióticos são utilizados com propósito de terapia, controle e prevenção de doenças, Phillips (2004), o que proporciona benefícios para os humanos e animais. Muitos antibióticos utilizados na alimentação animal não são absorvidos no trato gastrintestinal e poderiam ser eliminados nas fezes e urina dos animais e incorporados ao solo. Por estes motivos, a indústria avícola está enfrentando possível proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento, e, como consequência está procurando alternativas para prevenção de doenças e melhora do crescimento.

Com pesquisas recentes, surge a probabilidade de uma pequena mas significante mudança benéfica em animais tratados com probióticos. Culturas probióticas têm sido consideradas para exercer efeitos protetores contra patógenos via antagonismo direto ou por exclusão competitiva. O sucesso da colonização dos probióticos depende da sua estabilidade, sobrevivência, idade, estresse, hospedeiro, e frequência de administração (BOMBA et al., 2002). Esta colonização resulta num melhor controle de patógenos intestinais, Pollmann et al. (2005), além de melhor funções digestivas devido a presença das enzimas digestivas.

Considerando que o trato gastrintestinal é o primeiro órgão alvo dos probióticos, a descrição das inter-relações entre a microbiota hospedeira, a carga bacteriana e a integridade do epitélio auxiliam a determinação da escolha do probióticos adequado (KLAENHAMMER, 2012). A mucosa intestinal atúa na exclusão e eliminação de micro-organismos potencialmente nocivos que é essencial na manutenção da qualidade intestinal. A microbiota intestinal em aves adultas é um complexo ecossistema, mas em aves recém eclodidas não apresentaram uma população microbiana estável (YANG et al., 2009).

O modo de ação dos probióticos no organismo das aves é pouco conhecido. No sistema de produção animal benefícios e eficiência foram relatados, mas até agora muitos cientistas tem estudado os efeitos dos probióticos sobre algumas características fisiológicas, porém ainda não conseguiram desenvolver um modelo integral de como os probióticos agem no organismo das aves. O objetivo foi de avaliar

os efeitos da adição de três níveis de *Paenibacillus* sp. na alimentação de frangos de corte no desempenho, morfometria intestinal, do fígado e pâncreas e atividade pancreática em frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aves e manejo

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal/SP. Todas as práticas relacionadas ao projeto de estudo foram aprovadas pela Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, protocolo Nº 014237/13. O galpão usado foi tipo túnel com cortinas laterais. Foram utilizadas 20 parcelas com 20 aves cada, totalizando 400 pintinhos de corte machos da linhagem Ross 308 procedentes de incubatório comercial, criados de um até os 49 dias de idade distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado.

A cama foi composta de maravalha e não apresentou tratamento prévio, sendo constituída da material utilizado em galpões de frangos até terceiro uso misturado com cama de matrizes de um ano de uso, e, distribuída de modo que todos os tratamentos tivessem a mesma quantidade inicial deste material. Nas duas primeiras semanas de idade das aves, utilizaram-se nipples e comedouros tubulares infantis os quais foram substituídos gradativamente por comedouros tubulares com capacidade para 20 kg de ração, após a primeira semana de idade. O programa de luz e temperatura foi feito segundo protocolo de Bem-Estar para frangos e perus, UBA (2008). O aquecimento foi através de lâmpadas infravermelho de 250 watts. Foi registrada diariamente a temperatura ambiente e umidade relativa do ar (manhã e noite), utilizando-se termohigrômetros digitais distribuídos em três pontos do galpão aproximadamente a 10 cm da cama.

As rações experimentais foram isoproteicas e isoenergéticas dentro de cada fase de criação: inicial (1 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 35 dias de idade) e final (36 a 49 dias de idade) e foram formuladas seguindo a composição de

ingredientes e os níveis nutricionais indicados por (ROSTAGNO et al*.,* 2011) (Tabela 1). A ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante o período de criação. Os pintinhos foram vacinados contra a doença de Marek, Gumboro e Bouba Aviária no incubatório, seguindo-se da vacinação no 7º e 21º dias de idade contra a doença de Gumboro e no 7º dia de idade contra a doença de New castle. As vacinas foram realizadas durante o período experimental via água de bebida, utilizando leite em pó como veículo (2g/L).

2.2. Delineamento experimental e tratamentos

2.2.1. Análise estatística

2.2.1.1 Dose-resposta

Na comparação do tratamento do *Paenibacillus* sp. com os controles negativo e positivo, para avaliar o efeito dose-resposta dos diferentes níveis do *Paenibacillus* sp. foi utilizada análise de regressão através do procedimento PROC GLIMMIX, excluindo o controle positivo. Ajustou-se para o efeito linear e quadrático para calcular a equação de regressão segundo as análise de dose-resposta.

2.2.1.2 Análise de variância

A análise de variância incluiu cinco tratamentos e quatro repetições e usou-se o procedimento GLIMMIX do SAS Versão 9.3 (SAS, 2011). O modelo estatístico incluiu tratamentos como fator fixo e as repetições e medições como efeito aleatório. Foi utilizado o teste de Dunnett ao 5% de significância e da média dos mínimos quadrados (LSMEAN) para comparação de medias dos tratamentos com o controle negativo e da mesma forma com o controle positivo. Para as variáveis que tiveram várias medições em cada repetição usou-se a repetição como fator residual randomizado.

Testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros estudentizados (teste de Cramer-Von-Mises) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown-

Forsythe) (LITTELL et al., 2002). A diferença mínima significativa (LSD) foi calculada usando os efeitos dos erros padrão que foi considerado significativo nas análise de variância (P<0,05) nível de probabilidade. (DUNNETT, 1955, 1964).

Os tratamentos foram os seguintes:

- T1: Controle positivo (lincomicina, 20g/t);
- T2: Dieta controle sem aditivo;
- T3: 30 ppm/t de probiótico género *Paenibacillus* sp.*;*
- T4: 45 ppm/t de probiótico género *Paenibacillus* sp.*;*
- T5: 60 ppm/t de probiótico género *Paenibacillus* sp.*;*

2.3. Desempenho das aves

Foram avaliadas como características de desempenho, o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar (kg ração/kg peso) durante todas as fases e o ciclo completo de criação. Neste último foram avaliados os parâmetros de viabilidade e o índice de eficiência produtiva.

O ganho de peso (GP) foi obtido pela diferença entre o peso ao final de cada período e o peso inicial no alojamento, ou no início de cada período. O consumo de ração (CR) foi calculado pela diferença entre o total de ração fornecida e as sobras de ração no final de cada período, corrigidos pelo número das aves mortas. A conversão alimentar (CA) foi calculada pela razão entre o total de ração fornecida e o ganho de peso no período, e corrigida pelo número das aves mortas.

2.4. Morfometria intestinal, hepática e pancreática

2.4.1. Coleta de amostras para análise do intestino delgado

Para as análise histológicas do intestino, aproximadamente dois centímetros da porção média do duodeno, jejuno e íleo de 4 aves por tratamento, foram coletadas aos 14, 28 e 42 dias de idade e armazenados em frascos com solução de Bouin. Após de 24 horas, os fragmentos foram seccionados transversalmente, imersos em álcool

etílico a 70% para remoção do fixador e desidratados em séries crescentes de álcoois (70%, 80%, 90%, 95% e Absoluto I, II, III), diafanizados em xilol e incluídas em parafina. A seguir, foram realizados de cada bloco histológico, quatro cortes semiseriados de sete *µm* de espessura com intervalo de dez depreciações, de cada animal, para os cinco tratamentos dispostos sob as lâminas histológicas, totalizando 180 blocos (3 órgãos x 3 idades x 4 aves x 5 tratamentos), posteriormente corados segundo a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (BEHMER et al., 1976).

Para a determinação do número de células caliciformes foi usado o método de coloração pelo Periodic Acid Schiff (PAS), para detecção de mucinas neutras, ou Alcian Blue (AB) pH 2,5, para detecção de mucinas ácidas, segundo (McMANUS, 1948 e LEV e SPICER, 1964). Posteriormente, o material foi acondicionado em caixas histológicas numeradas de acordo com os tratamentos. As lâminas devidamente coradas foram analisadas ao microscópio óptico. A nomenclatura anatômica utilizada foi a de (BAUMEL, 1993). As 720 (180 blocos x 4 cortes) imagens pertinentes à avaliação morfométrica foram capturadas com o auxílio da microcâmera *Olympus DP 11* acoplada ao microscópio e armazenadas em um cartão de memória. As imagens, de interesse, do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) das aves foram descarregadas em um microcomputador e analisadas com o auxílio do software *Image Plus, Media Cybernetics*, Brasil, versão 4.1. As características morfométricas do duodeno, jejuno e íleo avaliadas incluíram o comprimento, a largura, o número de vilosidades e número de células caliciformes.

2.4.2. Coleta de amostras do fígado e pâncreas

Para análise dos parâmetros morfométricos do fígado e pâncreas, quatro aves de cada tratamento foram sacrificadas aos 14, 28 e 42 dias de idade. Foram extraídas amostras de aproximadamente dois cm^2 do pâncreas e do lobo esquerdo do fígado e fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Posteriormente foram lavadas em álcool 70% para retirada do fixador e desidratadas em série crescente de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A seguir, foram realizados de cada bloco histológico, quatro cortes histológicos de sete µm de espessura, de cada animal, para

os cinco tratamentos utilizados e colocados nas lâminas histológicas totalizando 120 blocos (2 órgãos x 3 idades x 4 aves x 5 tratamentos) realizando cortes histológicos semi seriados com intervalo de dez depreciações com espessura de sete µm, posteriormente corados segundo a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (BEHMER et al., 1976). O parâmetro hepático analisado foi o número de células de Kupffer do fígado. Com relação aos parâmetros pancreáticos foram medidas a área, diâmetro e perímetro das ilhotas de Langerhans e dos ácinos serosos.

2.5. Atividade enzimática

Os pâncreas foram coletados, pesados, identificados, acondicionados em papel alumínio, congelados e transportados em nitrogênio líquido para o laboratório, onde foram armazenados em freezer a -70°C. No laboratório de enzimologia aplicada (LEA), os pâncreas foram descongelados, o tecido adiposo aderente ao pâncreas removida e uma amostra do tecido foi moída, homogeneizada (Omni-GLH) em tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 contendo $CaCl_2$ 50 mM na proporção de 1:20 (peso:volume) e centrifugada a 14.000g por 30 minutos sob refrigeração a 4ºC, filtrado em lã de vidro, do material filtrado foram retiradas alíquotas, congeladas e armazenadas à -70ºC.

A concentração de proteína foi determinada utilizando-se soro albumina bovina fração V como padrão, através do método de Lowry modificado por (HARTREE, 1972). A atividade da α-amilase foi determinada a 37ºC, dosando-se a maltose liberada, a 530 nm (BERNFELD, 1955). Uma unidade de atividade enzimática (U) da α-amilase pancreática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de maltose/minuto/mg de proteína nas condições padrões do teste.

Uma vez ativado o tripsinogênio, a atividade da tripsina foi determinada descontinuamente a 37 ºC, por meio da liberação da p-nitroanilida ($\in$= 9620 M^{-1} cm^{-1}) a 410 nm (KAKADE et al., 1974). A atividade da quimotripsina foi determinada a 37 ºC, através da liberação da p-nitroanilida ($\in$= 8800 M^{-1} cm^{-1}) a 410 nm (ERLANGER et al., 1966). Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo 1 nmol de p-nitroanilida liberada por minuto/mg de proteína nas condições do teste. Usou-se um espectrômetro HITACHI U-2000.

Tabela 1. Composição percentual e análise calculada das rações experimentais

Ingredientes	Quantidade em kg		
(%)	Inicial	Crescimento	Final
	1 a 21 dias	22 a 35 dias	36 a 49 dias
Milho	58,67	63,61	66,49
Farelo de soja	35,20	29,70	27,40
Óleo de soja	2,20	2,80	3,40
Fosfato bicálcico	1,80	1,70	1,50
Calcário calcítico	1,00	1,00	0,10
DL- metionina	0,30	0,25	0,24
L-lisina HCl	0,13	0,25	0,27
Cloridrato de colina 60	0,10	0,09	0,05
Suplemento min. + vit.*	0,20	0,20	0,20
Sal	0,40	0,40	0,35
Total	100,00	100,00	100,00
Valores Calculados			
Proteína bruta (%)	21,05	19,00	18,10
Energia metabolizável (kcal/kg)	3000	3100	3170
Ca (%)	0,96	0,90	0,85
Na (%)	0,20	0,19	0,18
Fósforo total (%)	0,70	0,65	0,62
Fósforo disponível (%)	0,45	0,42	0,39
Metionina + cistina total (%)	0,97	0,86	0,82
Metionina + cistina digestível (%)	0,89	0,79	0,75
Metionina total (%)	0,64	0,55	0,52
Metionina digestível (%)	0,61	0,53	0,50
Lisina total (%)	1,23	1,18	1,14
Lisina digestível (%)	1,12	1,08	1,04
Treonina total (%)	0,92	0,81	0,78
Treonina digestível (%)	0,81	0,71	0,68

***** Enriquecimento por quilograma de ração: Vit. A 11000 UI, Vit.D_3 2000 UI, Vit. E 13 mg, Vit. K_3 2,5 mg, Vit. B_1 1 mg, Vit. B_2 5 mg, B6 1,5 mg, Vit. B_{12} 0,15 mcg, Ácido Fólico 0,5 mg, Biotina 0,05 mg, Niacina 35 mg, Pantotenato de Cálcio 13 mg, Cobre 6 mg, Cobalto 0,1 mg, Iodo 1 mg, Ferro 50 mg, Manganês 65 mg, Zinco 45 mg, Selênio 0,2 mg, Antioxidante 4 mg. Salinomicina 60mg.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância das variáveis, consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) para as fases inicial (1 a 21dias de idade), crescimento (22 a 35 dias de idade) assim como para as fases de 1 a 42 e 1 a 49 dias de idade, respectivamente encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Em todas as fases de alimentação, não houve efeito (P>0,05) dos tratamentos em todas as características de desempenho avaliadas. Contudo, no período de 36 a 42 dias de idade, observou-se que a conversão alimentar foi afetada linearmente (P<0,05), constatando-se melhora com o aumento dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. (CA = 2,092 – 0,002*P, R^2=0,98), está CA diminui em 0,54, 0,92 e 1,39 pontos em aves que consumiram níveis 30, 45 e 60ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. respectivamente.

O efeito de probióticos sobre o crescimento em frangos tem sido estudado extensivamente (Anexo 1). Sun et al. (2005) observaram melhor conversão alimentar na fase de 36 a 49 dias de idade, Jin et al. (1996, 1998 e 2000) e Mountzouris et al. (2010), relataram melhor desempenho em frangos de corte que receberam níveis de probióticos, como consequência da colonização do trato gastrintestinal e a competição com micro-organismos pelo local de aderência na superfície intestinal o que favorece as funções digestivas, meio ambiente e saúde do hospedeiro. Samli et al. (2007) reportaram aumento de peso e melhora da conversão alimentar em frangos de corte que receberam *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415) na ração, talvez devido ao aumento do número de bactérias produtoras de ácido láctico. Corroborando com esses autores, Cavazzoni et al. (1998) encontraram melhor desempenho de frangos de corte que foram arraçoados com o probiótico *B. coagulans* (CNCM I-1061) como aditivo na ração, sobre excelentes condições sanitárias e Apata (2008) que observou melhor desempenho quando receberam níveis do *Lactobacillus bulgaricus* na ração, possivelmente pelo uso de leite desnatado como veículo, que pode ter estimulado a digestão proteolítica ou a atividade das enzimas melhorando a digestão dos nutrientes.

Outros autores concluíram que o uso de probióticos não tem efeito sobre a conversão alimentar, Gunal et al. e Mutus et al. (2006), não encontraram diferença nos parâmetros de desempenho em frangos de corte tratados com probiótico (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Aspergillus orizea, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, Candida pintolepesii*) e *Bacillus licheniformis e Bacillus subtilis* aos 42 dias de idade. Priyankarage et al. (2010), Bai et al. e Chen et al. (2013), que não relataram diferenças em toda a fase de criação de frangos de corte. A eficácia do uso de probióticos depende de muitos fatores, como tipo de micro-organismo utilizado (espécie), o nível e tipo de administração, a idade da ave, as condições ambientais, etc. O aumento do ganho de peso não é só consequência do incremento do consumo de ração, e sim, da eficiência na utilização do alimento.

Tabela 2. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte machos na fase de 1 a 21, 22 a 35 e 36 a 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos	21 dias				35 dias				42 dias			
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	VC (%)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	VC (%)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	VC (%)
CP	1,118	0,807	1,39	100	2,179	1,228	1,77	99	1,348	0,690	1,96	96
CN	1,100	0,789	1,40	95	2,181	1,245	1,73	99	1,343	0,672	2,09	96
30	1,111	0,798	1,39	99	2,213	1,291	1,71	99	1,353	0,666	2,03	99
45	1,122	0,777	1,45	99	2,046	1,229	1,66	96	1,303	0,653	2,00	96
60	1,103	0,793	1,39	100	2,130	1,201	1,77	99	1,298	0,668	1,95	96
Teste F	0,24	0,89	1,61	0,75	0,90	1,73	1,20	0,52	0,94	0,26	2,48	0,46
Valor P	0,91	0,50	0,24	0,57	0,49	0,21	0,35	0,72	0,47	0,90	0,10	0,76
CV%	1,68	1,55	1,49	1,60	3,20	2,09	2,45	3,15	2,04	3,98	1,89	4,15
Regression												
L	0,752	0,857	0,475	0,432	0,391	0,241	0,864	0,438	0,182	0,796	0,032	0,934
Q	0,539	0,967	0,300	0,192	0,942	0,104	0,188	0,198	0,475	0,777	0,721	0,704

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.
*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

Tabela 3. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), viabilidade (V) de frangos de corte machos nas fases de 1 a 42 e 1 a 49 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos	1 a 42 dias				1 a 49 dias			
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	V (%)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	V (%)
CP	4,386	2,700	1,63	96	5,715	3,348	1,71	95
CN	4,375	2,694	1,63	96	5,722	3,329	1,72	95
30	4,442	2,704	1,64	99	5,773	3,399	1,70	95
45	4,190	2,608	1,61	96	5,483	3,272	1,68	95
60	4,300	2,612	1,65	99	5,582	3,253	1,72	99
Teste F	0,96	1,47	0,30	0,76	0,99	1,47	0,35	0,83
Valor P	0,46	0,27	0,88	0,46	0,44	0,27	0,84	0,36
CV%	2,29	1,56	1,71	4,15	2,12	1,59	1,85	5,84
***Regressão**								
L	0,388	0,142	0,847	0,818	0,261	0,212	0,735	0,860
Q	0,815	0,577	0,854	0,398	0,783	0,184	0,366	0,368

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.
*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

Parâmetros morfométricos

As respostas dos parâmetros histomorfométricos do intestino delgado das aves com 14, 28 e 42 dias de idade tratadas com diferentes probióticos encontram-se na Tabela 4.

Comprimento das vilosidades do intestino

As medidas do comprimento das vilosidades do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp. se encontram na Tabela 4. De acordo com a análise de variância e de regressão, pôde-se observar que não houve efeito significativo (P>0,05) dos tratamentos, para as médias do comprimento das vilosidades nas três fases de criação, assim mesmo, dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. sobre o controle negativo e positivo, respectivamente.

Estes resultados concordam com os observados por vários autores. Por exemplo, SUN et al. (2005) não encontraram diferenças na largura das vilosidades aos 14, 28, 35 e 49 dias tratados com diferentes prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos. SIEO et al. (2005) e TSIRTSIKOS et al. (2012) não verificaram diferenças na altura das vilosidades do duodeno e íleo em frangos de corte arraçoados com seis cepas (parenteral e transformado) de *Lactobacillus* sp. e probiótico PoultryStar ME (*Lactobacillus reuteri, Enterococcus faecium, Bifidobacterium animalis, Pediococcus acidilactici,* e *Lactobacillus salivarius)* respectivamente, como também, SAMANYA e YAMAUCHI (2002) e TAHERI et al. (2010) não detectaram diferenças no jejuno de aves aos 28 e 42 dias de idade tratados com o probiótico *Bacillus subtilis* var. *natto* e *Pediococcus* ácido láctico. SANTIN et al. (2001) encontraram diferenças na altura das vilosidades do duodeno, jejuno e íleo durante a primeira semana do experimento (7 dias), no final do segundo e terceiro período (28 e 42 dias) não observaram diferenças na altura das vilosidades em frangos de corte alimentados com *Saccharomyces cerevisiae* var. *Calsberg*, devido ao efeito positivo sobre a saúde intestinal, com melhor absorção dos ingredientes.

Existem muitos estudos do uso de probióticos nos parâmetros histomorfométricos do intestino (Anexo 2). Ao confrontar esses resultados com alguns trabalhos com a histomorfologia intestinal. GUNAL et al. (2006) encontraram diferenças na altura das vilosidades do jejuno e íleo em frangos de corte aos 21 e 42 dias de idades tratados com o probiótico (Protexin) (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Aspergillus orizea, Bifidobactoerium bifidum, Enterococcus faecium, Candida pintolepesii)* e ácidos orgânicos (fórmico e propiónico), provavelmente devido ao aumento das cadeias curtas de ácidos graxos que estimularam a proliferação de células no intestino (ICHIKAWA et al., 1999). YAZDANI et al. (2013) observaram maior comprimento das vilosidades do duodeno e jejuno das aves quando alimentadas com *Berberis vulgaris*, visto que contem alcaloides isoquinolínicos como a berberina, berbamina e palmatina responsáveis pelos efeitos benéficos. Ao utilizar probióticos a base de *Bacillus subtilis, Lactobacillus acidophilus* e *casei, Streptococcus lactis* e *faecium, Bifidobacterium bifidum* e *Aspergillus oryzae* o grupo de Pelicano et al. (2005) encontraram diferenças na altura das vilosidades do jejuno e íleo aos 21 do jejuno e íleo aos 45 dias de idade.

Os probióticos tem a capacidade de modificar a flora intestinal (FULLER, 1989) tornando-a um ambiente mais favorável aumentando o crescimento de bactérias anaeróbias facultativas não patogénicas e Gram positivas, suprimindo as patogénicas (YANG et al., 2009).

No presente experimento, o comprimento das vilosidades no duodeno, jejuno e íleo das aves não deferiram significativamente quando foram alimentados com os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp., embora tenha ocorrido numérico na sexta semana de idade, nas vilosidades de todos segmentos do intestino delgado de aves alimentadas com o probiótico *Paenibacillus* sp. comparadas com aves que receberam dieta controle e positivo, esta tendência também foi observada na segunda semana. Este resultado poderia ampliar a área superficial da vilosidade, portanto, aumentar a produção de enzimas e melhorar absorção dos nutrientes como consequência, favorecer a digestão que deveria estar refletida na resposta do desempenho do animal.

Tabela 4. Valores médios do comprimento do duodeno (CD), do jejum (CJ) e do íleo (CI) do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos	14 dias (*µm)*			28 dias (*µm)*			42 dias (*µm)*		
	CD	CJ	CI	CD	CJ	CI	CD	CJ	CI
CP	532,69	345,55	273,17	1248,48	1135,40	783,66	1374,93	1276,98	1130,48
CN	518,41	376,39	278,26	1457,00	1126,53	918,40	1458,13	1168,37	987,51
30	462,22	422,55	296,38	1246,34	1027,43	877,55	1531,88	1174,03	1045,15
45	570,68	364,51	283,07	1160,58	1151,02	848,78	1594,32	1221,11	1139,40
60	534,76	386,55	278,84	1326,45	970,19	669,28	1554,96	1367,04	1095,11
Teste F	1,92	0,60	0,47	1,15	0,64	1,53	0,88	1,53	0,47
Valor P	0,17	0,67	0,76	0,37	0,64	0,26	0,51	0,24	0,76
CV%	5,64	9,80	5,56	8,12	9,31	9,40	6,53	5,39	8,56
***Regressão**									
L	0,385	0,979	1,000	0,209	0,489	0,093	0,384	0,079	0,267
Q	0,368	0,584	0,385	0,146	0,773	0,318	0,703	0,194	0,765

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.
*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

Largura das vilosidades do intestino delgado

As medidas da largura das vilosidades intestinais dos frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, submetidos a níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. encontram-se na Tabela 5. Esta foi afetada (P<0,05) pelos tratamentos no duodeno e íleo aos 14 dias de idade, não obstante, não houve influencia (P>0,05) no jejum. Aos 28 dias de idade houve diferença (P<0,05) na largura das vilosidades no duodeno, porém, não houve efeito (P>0,05) no jejuno e íleo. Aos 42 dias de idade não deferiu a largura das vilosidades (P>0,05) em nenhuma das três seções avaliadas.

A largura das vilosidades do duodeno foi afetada (P<0,05) quadráticamente aos 14 dias de idade pelos níveis de inclusão do probiótico *Paenibacillus* sp. com a máxima resposta ao nível de 42 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. (LD = 31,87 + 0,42 P – 0,005 P^2, R^2 = 0,67) e um efeito linear (P<0,05) aumentando a largura das vilosidades conforme há redução na concentração do probiótico *Paenibacillus* sp. aos 28 dias de idade (LD = 101,14 – 0,387 P, R^2 = 0,51).

Aos 14 dias de idade, a largura das vilosidades do duodeno foi maior (P<0,05) para os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. e controle positivo, assim como, no íleo para o nível 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. que o controle negativo. Enquanto, que o controle negativo no duodeno foi menor (P<0,05) e o nível 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no jejuno e íleo e o nível 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. para a largura das vilosidades do íleo apresentou médias maiores (P<0,05) que o controle positivo. Aos 28 dias de idade, os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. para a largura das vilosidades do duodeno foi menor (P<0,05) que o controle negativo, assim como, o nível 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. foi menor (P<0,05) que o controle positivo (Tabela 5).

Estes resultados concordam com os observados por GUNAL et al. (2006). Este grupo não encontrou diferenças na largura das vilosidades intestinais aos 21 e 42 dias de idade em frangos de corte tratados com o probiótico Protexin (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Aspergillus orizea,*

Bifidobactoerium bifidum, Enterococcus faecium, Candida pintolepesii) e ácidos orgânicos (fórmico e propiônico). Frangos que receberam níveis de extrato de *Berberis vulgaris* não apresentaram diferenças na largura das vilosidades aos 45 dias de idade (YAZDANI et al., 2013). De forma similar, Saki et al. (2011) reportaram que não houve alteração no duodeno e íleo durante os 14 e 42 dias mas aos 21 dias observaram diferenças na largura das vilosidades em frangos de corte alimentados com proporções de peptina e celulose. Da mesma forma, Hassanpour et al. (2013) encontraram diferenças na largura das vilosidades do jejuno aos 22 e 42 dias, não entanto, no duodeno em frangos de corte tratados com simbiótico à base de probiótico *Enterococcus faecium* (DSM 3530), probiótico fructo-oligosacárideo e ficofitico. Igualmente, em frangos tratados com um extrato (*Allium sativum*) e um probiótico (*Thymus vulgaris*) Shams et al. (2012) concluíram que existem diferenças na largura das vilosidades do duodeno aos 42 dias de idade, porém, não no jejuno devidas aos tratamentos. Rajput et al. (2013b) indicaram efeitos de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus subtilis* B10 aos 72 dias de idade em frangos Sanhuang (raça chinesa) da largura das vilosidades do jejuno e íleo. Assim, com o uso da enzima à base 3500 U B-glucanase, 600 U xylanase, e 10,2 U celulase (Safizuyme GP 800), Afsharmanesh et al. (2013) observaram diferenças na largura das vilosidades do íleo aos 42 dias de idade. Finalmente, tem sido estabelecido que espécies de probióticos pertencentes a *Enterococcus* sp*., Bacillus* sp*., Lactobacillus* sp*., Bifidobacterium* sp*., Streptococcus* sp*., Aspergillus* sp*., Candida* sp. exercem efeito na modulação da microbiota e morfologia e morfometria intestinal.

O aumento da largura das vilosidades pode ser devido à ação dos probióticos melhorando o pH do intestino, e, consequentemente reduzindo a colonização de micro-organismos enteropatogênicos, Fuller (1989); Samli et al. (2007) entre eles, *Clostridium* sp. e *E. coli*. Aumento da largura das vilosidades está associado a maior área superficial, portanto, maior absorção de nutrientes, mas isso não foi observado neste experimento, talvez, porque a mantenção do trato gastrintestinal saudável, como resposta na proteção contra micro-organismos patógenos, requer rápida reposição celular o que gera maior gasto de energia diminuindo a sua utilização para o crescimento ou produção do animal.

Tabela 5. Largura da vilosidade do duodeno (LD), do jejuno (LJ) e do íleo (LI) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos	14 dias (*µm*)			28 dias (*µm*)			42 dias (*µm*)		
	LD	LJ	LI	LD	LJ	LI	LD	LJ	LI
CP	37,84[a]	28,11	30,67	99,41	87,76	82,69	101,45	93,37	92,46
CN	31,82[x]	29,31	31,89	104,44	84,63	84,59	105,17	90,91	93,22
30	40,38[a]	37,22[x]	39,30[ax]	82,11[a]	83,82	85,50	88,11	90,37	95,74
45	40,37[a]	31,06	36,13	85,34[a]	77,60	83,02	96,20	88,68	98,25
60	39,38[a]	31,63	37,02[x]	80,37[ax]	81,75	73,21	96,35	98,66	96,96
Teste F	6,30	2,31	47,69	4,69	22,95	23,95	0,78	0,68	26,37
Valor P	0,0035	0,1100	0,0089	0,0118	0,6244	0,4261	0,5578	0,6166	0,9800
CV%	3,79	7,40	4,47	5,62	6,60	6,76	7,70	5,21	8,48
***Regressão**									
L	0,002	0,658	0,060	0,002	0,508	0,173	0,470	0,340	0,693
Q	0,023	0,110	0,077	0,134	0,820	0,210	0,294	0,208	0,890

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Número das vilosidades do intestino delgado

O número das vilosidades intestinais dos frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, submetidos a níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. se encontram na Tabela 6. De acordo com a análise de variância pôde-se observar que houve efeitos significativos dos tratamentos para o número de vilosidades intestinais nas fases de desenvolvimento das aves.

Aos 14 e 28 dias de idade, o número de vilosidades do duodeno, jejuno e íleo não foi influenciado (P>0,05) pelos tratamentos, no entanto, houve um efeito (P<0,05) aos 42 dias de idade (Tabela 6). Pôde-se observar que o número de vilosidades no jejuno aumentou linearmente conforme as concentrações do probiótico *Paenibacillus* sp. as quais apresentaram maior número de vilosidades aos 28 e 42 dias de idade, a mesma tendência se observou no duodeno e íleo aos 42 dias de idade (P<0,05).

O número de vilosidades no duodeno aos 42 dias de idade foi menor (P<0,05) no controle positivo e nos níveis 30 e 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp.. No entanto, o controle negativo no duodeno, níveis de 45 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no jejuno e nível de 60 ppm no probiótico *Paenibacillus* sp. no íleo, apresentaram médias maiores (P<0,05) no número de vilosidades que o controle positivo.

Estes resultados concordam com Pelicano et al. (2005) que não constataram diferenças na densidade das vilosidades intestinais entre os grupos que receberam probióticos ou prebióticos e controle negativo. Esses autores sugerem a utilização de MOS com um probiótico ou várias culturas de probióticos para obter maior densidade de vilosidade. Miles et al. (2006) relataram maior número de vilosidades do duodeno em aves mais jovens e que receberam virginamicina. Porém os mesmos autores, não detectaram diferenças nesta variável na 1ª, 3 ª e 5 ª semana de vida utilizando virginamicina e bacitracina contra um controle negativo sem aditivos em frangos de corte, assim mesmo, o grupo do Pelicano et al. (2007) também não observaram diferenças na densidade das vilosidades intestinais entre os grupos aos 42 dias.

Maior número de vilosidades está relacionado com maior área ou superfície de absorção. Neste estudo, observou-se que, os animais tratados com *Paenibacillus* sp apresentaram maior número de vilosidades o que acarretou em melhor eficiência no aproveitamento dos nutrientes na fase de 36 a 42 dias de idade.

Tabela 6. Número de vilosidades do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com diferentes níveis do probiótico *Paenibacillus* sp.

Tratamentos		14 dias			28 dias			42 dias		
		Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
CP		13,26	14,53	13,26	13,69	15,32	15,18	16,03^{a}	16,55	15,38
CN		13,08	12,90	13,13	13,20	15,53	15,43	19,79^{x}	16,46	16,46
30		15,32	16,14	13,50	16,38	17,48	16,65	16,41^{a}	18,79	16,70
45		13,48	15,75	15,32	15,25	19,54	15,56	16,70^{a}	20,29^{ax}	16,86
60		15,14	14,86	13,70	16,75	19,09	17,45	17,07	20,94^{ax}	19,33^{x}
Teste F		0,92	1,32	0,78	2,02	2,74	1,17	4,13	5,00	2,30
Valor P		0,48	0,31	0,56	0,14	0,07	0,37	0,02	0,01	0,12
CV%		8,33	7,44	7,29	7,44	6,86	5,65	4,30	5,79	6,09
***Regressão**										
L		0,3854	0,1355	0,4369	0,0682	0,0148	0,2175	0,0237	0,0083	0,0507
Q		0,7670	0,0826	0,5714	0,5656	0,6177	0,7286	0,0673	0,8459	0,1156
Intercepto	**a**	-	-	-	-	15,654	-	19,090	16,517	15,986
Coeficientes	**b**	-	-	-	-	0,070	-	-0,050	0,080	0,040
	b^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Número de células caliciformes do intestino delgado

De acordo com a análise de variância no número de células caliciformes, (Tabela 7) pôde-se observar que houve efeito (*P*<0,05) dos tratamentos no duodeno, jejuno e íleo em todas as fases de criação. Sendo este efeito linear para o número de células caliciformes no duodeno e quadrático para o íleo nas três fases de criação. No entanto, o jejuno apresentou um efeito quadrático aos 14 dias e linear aos 42 dias de idade, mostrando, em média, a máxima resposta ao nível de 27 ppm de *Paenibacillus* sp.

Aos 14 dias de idade, o controle positivo e os tratamentos com níveis crescentes do probiótico *Paenibacillus* sp. no duodeno assim como, o nível 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no jejuno e íleo apresentaram menores (*P*<0,05) números de células caliciformes que o controle negativo. O controle negativo apresentou maior número de células caliciformes (*P*<0,05) no duodeno, no entanto, o nível 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no jejuno e íleo foi menor (*P*<0,05) que o controle positivo. Aos 28 dias de idade, os níveis 30 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no duodeno assim como, o nível 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no jejuno apresentaram maiores (*P*<0,05) número de células caliciformes, porém, os níveis 45 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. apresentaram menor número de células caliciformes (*P*<0,05) no íleo que o controle negativo. No entanto, os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. no duodeno e o 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no jejuno apresentaram maiores (P<0,05) números de células caliciformes que o controle positivo. Aos 42 dias de idade, o nível 45 ppm do *Paenibacillus* sp. no duodeno e jejuno e o nível 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no duodeno e íleo apresentaram maiores (P<0,05) número de células caliciformes que o controle negativo. Porém, os níveis 45 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no duodeno e 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. no jejuno, apresentaram maiores (*P*<0,05) número de células caliciformes que o controle positivo.

Estes resultados concordam com os observados por vários autores. Por exemplo, Ashraf et al. (2013), encontraram diferenças no número das células caliciformes no duodeno, jejuno e íleo aos 42 dias de idade em frangos de corte tratados com probióticos e mananoligasacarídeos submetidos ao estresse

térmico cíclico, pode ser atribuído à regulação da expressão do gene que promove produção de mucina, aceleração da diferenciação e efeitos imunoestimuladores dos probióticos, referenciado por (BAURHOO et al., 2007 e SOLIS de los SANTOS et al., 2007). Utilizando um probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei, Bifidobacterium bifidum,* e *Enterococcus faecium*) em frangos de corte, Smirnov et al. (2005) reportaram diferenças no número de células caliciformes do jejuno e íleo sobre o tratamento com avilamicina. Isto acontece devido às interações microbianas com a mucosa devido a produção de ácido láctico pelo probiótico. Aliakbarpour et al. (2012) encontraram diferenças do número de células caliciformes no jejuno em frangos de corte aos 42 dias de idade tratados com probióticos monobacterial (*Bacillus subtilis*) e multibactéria (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Bifidobacterium bifidum,* e *Enterococcus faecium*), provavelmente também pela produção de ácido láctico pelo probiótico. Rodríguez-Lecompte et al. (2012) encontraram diferenças no número de células caliciformes no duodeno e jejuno aos 11 e íleo aos 22 dias de idade em frangos de corte tratados com probiótico à base de *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Streptococcus faecium*, e *Saccharomyces cerevisiae* e ácidos orgânicos à base de ácido ascórbico e cítrico. Assim, Bradley et al. (1994), observaram diferença no número de células caliciformes em frangos de corte tratados com levedura (Yeast, *Saccharomyces cerevisiae* var*. Boulardii*, Levucell SB20) aos 35 dias de idade, o que pode ser indicativo de alteração na ecologia da microbiota intestinal, Larson (1989), por causa da menor concentração de bactérias produtoras de metabolitos tóxicos, Radecki et al. (1992), ou pela habilidade da *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* de suprimir os efeitos destes metabolitos tóxicos (STANLEY et al.,1993).

Alguns pesquisadores não obtiveram estes efeitos, Reisinger et al. (2012), estudaram o efeito de levedura (Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*) em frangos de corte e não observaram diferenças no número de células caliciformes por vilo no jejuno aos 35 dias de idade. Geier et al. (2011) não encontraram diferenças no número de células caliciformes no íleo em frangos de corte tratados com lactoferrina aos 36 dias de idade.

O muco representa a primeira e maior barreira contra agentes patógenos ou infeções no intestino e a produção deste está relacionada com a quantidade de células caliciforme, como esperado, o controle com lincomicina diminuiu a quantidade de células caliciformes e a suplementação de probióticos melhorou ou manteve o número de células caliciformes. A mudança na composição da microbiota pode ter gerado mudança no pH do intestino e consequentemente um aumento da células caliciformes.

Tabela 7. Número de células caliciformes do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos		14 dias			28 dias			42 dias		
		Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
CP		144,38[a]	301,63	303,69	44,06	79,63	81,65	39,94	72,13	72,38
CN		198,02[x]	302,88	324,25	45,69	93,19	101,88	40,81	67,19	67,75
30		141,44[a]	206,06[ax]	231,25[ax]	72,30[ax]	90,31	73,84[a]	42,25	76,87	68,48
45		143,38[a]	271,69	283,69	58,29[x]	115,25[ax]	71,25[a]	54,50[ax]	95,39[ax]	68,25
60		132,19[a]	318,31	345,56	66,50[ax]	95,83	93,07	54,50[ax]	79,69	91,07[a]
Teste F		7,10	12,80	11,36	9,99	4,59	4,60	4,14	2,55	2,87
Valor P		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0024	0,0027	0,0045	0,0468	0,0300
CV%		7,72	8,74	5,40	6,95	8,20	9,38	9,63	8,92	10,56
***Regressão**										
L		<0,0001	0,4608	0,4508	0,0011	0,1478	0,0124	0,0048	0,0244	0,0191
Q		0,0860	<0,0001	<0,0001	0,0849	0,7552	0,0007	0,5436	0,1635	0,0183
Intercepto	**a**	188,44	300,28	322,71	50,61	-	102,44	39,31	69,46	68,38
Coeficientes	**b**	-1,04	-5,67	-5,94	0,30	-	-1,77	0,26	0,32	-0,60
	b^2	-	0,1018	0,1066	-	-	0,0262	-	-	0,0159

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Número de células de Kupffer do fígado

O número de células de Kupffer no fígado dos frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, submetidos a dietas experimentais se encontram na Tabela 8. De acordo com a análise de variância pôde-se observar que houve efeito (*P*<0,05) dos tratamentos para o número de células de Kupffer no fígado nas diferentes fases de desenvolvimento das aves.

Através da análise de regressão, pode-se observar que o número de células de Kupffer apresentou efeito quadrático (P<0,05) dos níveis de inclusão do probiótico *Paenibacillus* sp. com a máxima resposta ao nível de 57 e 35 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. aos 14 e 28 dias de idade, respectivamente, no entanto, houve um efeito linear (*P*<0,05) com aumento do número das células de Kupffer conforme os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. foram mais elevados (K = 35,84 + 0,1919 P, R^2 = 0,69) aos 42 dias de idade.

Aos 14 dias de idade, o número de células de Kupffer foi maior (*P*<0,05) para os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. que o controle negativo, assim como frangos tratados com 45 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. apresentaram maior (*P*<0,05) número de células de Kupffer que o controle positivo. Aos 28 dias de idade, aves tratadas com os níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. e controle positivo apresentam maior número (*P*<0,05) de células de Kupffer que o controle negativo, no entanto, aves percententes aos controle negativo apresentaram menor (*P*<0,05). Já os frangos tratados com 30 ppm de *Paenibacillus* sp. tiveram maior (*P*<0,05) número de células de Kupffer que o controle positivo. Aos 42 dias de idade, o controle positivo e os níveis 30 e 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. proporcionaram maior (*P*<0,05) número de células de Kupffer que o controle negativo, porém, o controle negativo apresentou menor (*P*<0,05) número de células de Kupffer que o controle positivo.

Neumann et al. (1998) encontraram maior número de células de Kupffer no fígado de ratos tratados com *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 em comparação com ratos livre de micro-organismos, que pode explicar uma melhor capacidade de eliminação de agentes patógenos. Rishi et al. (2011) encontraram menor número de células de Kupffer necróticas em ratos tratados com *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus plantarum* e L-arginina induzidos com

uma endotoxina bacteriana/lipopolisacarídeo (LPS), que pode ser devido à síntese de mediadores anti-inflamatórios e melhora na resposta de citoquinas (FU et al., 2005).

As células de Kupffer desempenham um papel importante na destruição de patógenos (BEATTIE et al., 2010). Neste estudo, houve melhora do desempenho na fase final (36 a 42) dias, isto também pode ser explicado pelo aumento do número de células de Kupffer na ajuda contra os patógenos.

Tabela 8. Número de células de Kupffer do fígado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos		Células de Kupffer		
		14 dias	28 dias	42 dias
CP		29,25	38,67[a]	44,33[a]
CN		21,25	29,50[x]	34,25[x]
30		37,93[a]	53,25[ax]	46,25[a]
45		53,00[ax]	42,00[a]	41,50
60		45,25[ax]	43,25[a]	47,25[a]
Teste F		<0,0001	<0,0001	0,0043
Valor P		30,16	34,82	6,21
CV%		8,28	3,75	5,10
***Regressão**				
L		<0,0001	<0,0001	0,0014
Q		0,0090	<0,0001	0,2078
Intercepto	**a**	20,44	30,26	35,84
Coeficientes	**b**	0,96	1,05	0,19
	b^2	-0,0084	-0,015	-

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Área total, perímetro e diâmetro dos ácinos serosos do pâncreas

As medidas da área total, perímetro e diâmetro dos ácinos serosos do pâncreas de frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, tratados com o probiótico *Paenibacillus* sp. encontram-se na Tabela 9. Pôde-se observar que houve efeito significativo dos tratamentos para todos os parâmetros nas fases de desenvolvimento das aves.

A área total, perímetro e diâmetro apresentaram efeito significativo (P<0,05) dos tratamentos aos 14 dias com efeito linear para a área total e efeito quadrático com máxima resposta ao nível de 33 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. para o perímetro e diâmetro nos ácinos serosos. Aos 28 dias de idade, houve efeito significativo (P<0,05) no perímetro e diâmetro nos ácinos serosos com máxima resposta ao nível de 24 ppm de *Paenibacillus* sp.. Aos 42 dias de idade, não houve efeito significativo (P>0,05) dos tratamentos nas variáveis estudadas. Aos 14 dias de idade, a área total, perímetro e diâmetro dos ácinos serosos em aves tratadas com 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. e perímetro do nível de 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. foram maiores (P<0,05) que o controle negativo e positivo, respectivamente. Aos 28 dias de idade, o nível 30 ppm do *Paenibacillus* sp. proporcionou maior (P<0,05) perímetro dos ácinos serosos que o controle positivo. Aos 42 dias de idade, o nível 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. apresentou menor (P<0,05) perímetro dos ácinos serosos que o controle negativo, porém, o nível 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. apresentou maior perímetro (P<0,05) que o controle positivo.

Estes dados concordam com os observados por, Dorigan et al. (2011), que encontraram diferenças da área, perímetro, diâmetro nos ácinos serosos em frangos de corte tratados com feno de folhas de amoeira aos 21 dias de idade, como consequência de desorganização tecidual que provocou hiperplasia e compressão celular. A função secretora do pâncreas pode ser medida pela quantidade de liberação da amilase, Linari et al. (2001), e isto pode explicar a relação de um aumento dos ácinos serosos e a atividade da amilase neste experimento (Anexo 1 e 2).

Tabela 9. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) dos ácinos serosos no pâncreas de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos		14 dias (*µm*)			28 dias (*µm*)			42 dias (*µm*)		
		AT	PE	D	AT	PE	D	AT	PE	D
CP		167,85	52,18	19,09	258,42	66,43	25,29	326,55	73,62	28,25
CN		168,06	52,00	19,22	257,38	68,19	26,03	332,54	76,27	29,01
30		177,36	56,14^{ax}	20,57	251,87	70,18^{x}	26,54	334,54	77,94^{x}	29,43
45		178,22^{ax}	56,17^{ax}	21,02^{ax}	257,18	67,80	26,09	326,58	73,18^{a}	27,72
60		175,61	52,97	19,68	250,79	65,56	24,69	323,66	75,40	28,51
Teste F		3,00	7,08	3,30	0,78	4,20	2,56	1,15	4,87	1,64
Valor P		0,0200	0,0038	0,0398	0,5500	0,0232	0,0393	0,3300	0,0009	0,1600
CV%		1,73	1,48	2,34	1,56	1,34	1,79	1,30	1,18	1,82
***Regressão**										
L		0,0389	0,1513	0,2336	0,4454	0,0793	0,0769	0,1083	0,1134	0,2076
Q		0,0976	0,0019	0,0311	0,9826	0,0201	0,0198	0,3069	0,5112	0,7749
Intercepto	**a**	170,04	51,95	19,17	-	68,25	26,02	-	-	-
Coeficientes	**b**	0,1413	0,2802	0,1004	-	0,1505	0,0616	-	-	-
	b^2	-	-0,0043	-0,0015	-	-0,0033	-0,0014	-	-	-

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Área total, perímetro e diâmetro das ilhotas pancreáticas (Langerhans)

As medidas da área total, perímetro e diâmetro das ilhotas pancreáticas (Langerhans) dos frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, submetidos a níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. encontram-se na Tabela 10. De acordo com a análise de variância pôde-se observar que houve efeito significativo dos tratamentos para todas as medidas registradas nas diferentes fases de desenvolvimento das aves.

Houve efeito (P<0,05) dos tratamentos na área total, perímetro e diâmetro das células pancreáticas aos 14 dias e a área total aos 42 dias de idade. Através da análise de regressão, houve efeito (P<0,05) quadrático na área total mostrando em média a máxima resposta ao nível de 27 ppm de *Paenibacillus* sp. aos 14 e 42 dias de idade e um aumento linear (P<0,05) na resposta no perímetro e diâmetro das ilhotas pancreáticas aos 14 dias de idade. O nível de 60 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. apresentou maior área total, perímetro e diâmetro (P<0,05) das ilhotas pancreáticas que o controle negativo e positivo aos 14 dias de idade, respectivamente. Aos 42 dias de idade, os níveis 30 e 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. na área total e nível 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. e controle negativo no perímetro foram menores (P<0,05) que o controle positivo. Em quanto, o nível 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. e o controle positivo apresentaram menor e maior (P<0,05) área total e perímetro que o controle negativo, respectivamente.

Tabela 10. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) das células pancreáticas (ilhotas de Langerhans) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos contendo *Paenibacillus* sp.

Tratamentos		14 dias (*µm*)			28 dias (*µm*)			42 dias (*µm*)		
		AT	PE	D	AT	PE	D	AT	PE	D
CP		354834	69941	25290	519003	82686	29268	500101	85330[a]	30682
CN		354835	68873	25198	426505	77121	27703	442580	77199[x]	28114
30		297524	71720	26207	472711	85137	29971	368745[ax]	76709[x]	28032
45		318760	71127	26007	425154	82330	28630	385755[x]	78918	28408
60		444285[ax]	81862[ax]	29729[ax]	490251	84594	30167	447858	83763	30245
Teste F		5,43	4,34	3,55	1,26	1,09	0,96	4,08	1,90	1,35
Valor P		0,0108	0,0021	0,0079	0,3385	0,396	0,4276	0,0033	0,1107	0,2527
CV%		7,16	3,85	4,31	8,28	3,69	3,56	6,10	3,55	3,76
***Regressão**										
L		0,024	0,003	0,008	0,409	0,146	0,149	0,804	0,127	0,224
Q		<0,0001	0,078	0,121	0,863	0,434	0,719	0,007	0,226	0,295
Intercepto	**a**	356291	67247	24635	-	-	-	442830	-	-
Coeficientes	**b**	-6059,57	181,49	63,40	-	-	-	-5110,05	-	-
	b^2	123,95	-	-	-	-	-	86,36	-	-

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Atividade enzimática do pâncreas

As atividades das enzimas pancreáticas aos 28 e 42 dias de idade são apresentadas na Tabela 11 (µmol/min/mg proteína) e Tabela 12 (Unidades totais micromols) em frangos de corte submetidos a dietas experimentais.

A análise de variância da atividade de enzimas pancreáticas (Tabela 11) revelarou que, exceto para a amilase (P<0,05) aos 28 dias de idade, não houve efeito (P>0,05) dos tratamentos em todas as fases de criação. A amilase apresentou um efeito linear e quadrático (P<0,05) pelos níveis de *Paenibacillus* sp. aos 28 e 42 dias de idade. Houve resposta positiva com o aumento dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. (Amilase = 149,46 + 0,64 P, R^2 = 0,32) com resposta enzimática máxima em aves tratadas com 37 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. (Amilase = 253,65 – 4,26 P + 0,058 P^2, R^2 = 0,93). Em comparação com o controle negativo, o nível 45 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. acarretou aumento (P<0,05) da atividade da amilase aos 28 e quimotripsina aos 42 dias, no entanto, a amilase foi menor que o controle negativo aos 42 dias de idade em frangos de corte.

Não houve efeito (P>0,05) dos tratamentos em todas as variáveis enzimáticas aos 28 e 42 dias de criação (Tabela 12). Foi observada diminuição (P<0,05) quadrática da amilase com o aumento dos níveis do probiótico *Paenibacillus* sp. (amilase = 4577,13 + 116,96 P - 1,781 P^2, R^2 =0,64) com resposta enzimática mínima ao nível de 33 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp., e linear (P<0,05) na quimotripsina (296,03 – 1,62 P, R^2 =0,50). A quimotripsina aos 42 dias apresentou maior (P<0,05) atividade enzimática sobre o controle negativo.

Resultados similares tem sido documentados por vários autores do efeito do probióticos na atividade enzimática do pâncreas em termos de atividade proteolítica. Por exemplo, Matur et al. (2007), não encontraram diferenças na atividade da amilase, tripsina e quimotripsina em frangos de corte aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com probióticos à base de *Enterococcus faecium* NCIMB10415 (Cylactin, Roche), talvez porque os probióticos podem afetar a biossíntese das enzimática pâncreáticas, devido ao seus efeitos na microbiota intestinal. Assim, Pinheiro et al. (2004), encontraram aumento na atividade das enzimas pancreáticas em aves submetidas a

restrição alimentar e suplementação do complexo enzimático (*Aspergillus oryzae, Bacillus subtilis*), isto pela presença do alimento por maior tempo no trato gastrintestinal e a capacidade de adaptação do trato gastrintestinal como resposta as trocas metabólicas e fisiológicos. Foram encontradas diferenças na atividade da amilase em aves tratadas com diferentes níveis de cisteamina (derivado do metabolismo da cisteína), como consequência de uma depleção da somastotatina pela cisteamina que pode causar uma melhora do trato gastrintestinal, digestão das enzimas e incremento das enzimas pancreáticas e intestinais (YANG et al., 2006). Lima et al. (2003) não encontrou efeito do probiótico (*Bacillus subtilis*) sobre a atividade enzimática da amilase pancreática das aves.

No entanto, vários pesquisadores tem relatado que não existem efeitos dos probióticos na atividade de enzimas pancreáticas. Nesse sentido, Zhang et al. (2012) não encontraram diferenças na atividade da amilase pancreática em aves alimentadas com folhas de ginkgo aos 42 dias de idade. Feng et al. (2007) trabalhando com farelo de soja e fermentado de farelo de soja (com *Aspergillus oryzae* 3.042) não observaram diferenças na atividade da amilase aos 21 e 42 dias, no entanto, encontraram uma diminuição na atividade da tripsina aos 21 dias de idade, por causa da presença de inibidores de tripsina ou outros fatores antinutricionais. Da mesma forma, Mahmood et al. (2007), observaram diferenças na atividade da quimotripsina aos 42 dias de idade tratados com salseed (*Shorea robusta*) em frangos de corte.

Com exceção da água e de minerais, os animais dependem da ação de enzimas pancreáticas, as quais desempenham papel importante na digestão e absorção de nutrientes. Neste estudo, o aumento da atividade da amilase sugere que houve maior digestão do amido o que pode ter melhorado a absorção, diminuindo a viscosidade da digesta e acarretando melhora significativa da conversão alimentar na fase final de criação.

Tabela 11. Atividade de enzimas pancreáticas (µmol/min/mg proteína) aos 28 e 42 dias de idade em frangos de corte submetidos a níveis do probiótico *Paenibacillus* sp.

Tratamentos	Peso pâncreas (g)	28 dias			42 dias		
		Amilase	Tripsina	Quimotripsina	Amilase	Tripsina	Quimotripsina
CP	3,52	179,19	24,08	6,84	198,05	18,78	10,13
CN	3,23	144,47	26,23	8,33	252,10	16,44	7,36
30	3,61	161,48	22,13	7,55	187,55	15,88	8,32
45	3,36	212,45[a]	19,20	8,09	167,57[a]	18,27	12,60[a]
60	2,93	165,68	24,34	5,38	212,56	21,19	9,01
Teste F		3,89	0,40	1,19	2,51	0,67	2,11
Valor P		0,02	0,81	0,36	0,09	0,63	0,14
CV%		7,60	18,49	15,41	10,29	13,66	15,92
***Regressão**							
L		0,031	0,561	0,079	0,0581	0,146	0,123
Q		0,097	0,386	0,253	0,054	0,237	0,434

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Tabela 12. Atividade de enzimas pancreáticas (unidades totais micromols) aos 28 e 42 dias de idade em frangos de corte submetidos a níveis do probiótico *Paenibacillus* sp.

Tratamentos		28 dias			42 dias		
	Peso pâncreas (g)	Amilase	Tripsina	Quimotripsina	Amilase	Tripsina	Quimotripsina
CP	3,52	6407,11	861,27	243,27	7812,02	758,36	422,38
CN	3,23	4687,26	868,15	271,77	11035,00	717,43	329,90
30	3,61	5822,54	795,28	274,96	8169,51	700,63	378,50
45	3,36	7115,37	662,13	264,57	8418,30	889,70	621,63[a]
60	2,93	4853,78	725,49	153,45	9378,92	939,72	394,02
Teste F		2,01	0,28	1,64	1,91	0,89	2,36
Valor P		0,1442	0,888	0,216	0,164	0,495	0,124
CV%		12,87	22,61	17,23	10,89	13,92	20,46
***Regressão**							
L		0,354	0,469	0,051	0,166	0,081	0,158
Q		0,047	0,854	0,070	0,123	0,366	0,352

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 45: 45 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; 60: 60 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.

*Tratamento controle positivo (CP) não foi parte da análise de regressão.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o probiótico *Paenibacillus sp.* não afetou o desempenho, no entanto, influenciou a morfometria intestinal e na atividade das enzimas pancreáticas em frangos de corte.

Na última fase, a conversão alimentar melhorou proporcionalmente em relação aos níveis de probióticos oferecidos na ração. O probiótico *Paenibacillus* sp. não interferiu no comprimento das vilosidades intestinais. No entanto, pode-se observar um aumento e diminuição da largura das vilosidades duodenais aos 14 e 28 dias de idade, respectivamente. Aos 42 dias, o número de vilosidades jejunais e do íleo aumentou à medida em que se adicionaram níveis crescentes de probióticos.

Aos 14 dias, as células caliciformes foram mais abundantes nas alças duodenais das aves do controle negativo e menos frequentes no jejuno e íleo das aves tratadas com 30 ppm do probióticos *Paenibacillus* sp.. Porém, no tratamento com 30 ppm de probiótico, a ave apresentou maior superfície intestinal (Anexo 5), o que permite inferirmos que há uma dispersão das células caliciformes na área específica analisada. Aos 28 dias observamos uma tendência de aumento das células caliciformes, consolidando efetivamente aos 42 dias nas três regiões analisadas (duodeno, jejuno e íleo). Baseado no aumento do número das células caliciformes**,** das vilosidades e do aumento da largura das vilosidades associadas à melhor conversão alimentar na fase final, concluímos que o uso de probióticos favoreceu a morfometria intestinal, e, consequentemente, proporcionou às aves melhor desempenho nesta fase. Diante disso, sugerimos que as respostas morfométricas intestinais interferiram positivamente no desempenho das aves na última fase de desenvolvimento (36 a 42 dias), desencadeando melhor conversão alimentar, e, consequentemente, melhores resultados de desempenho.

A falta de respostas dos probióticos nas fases de 14 e 28 dias pode ser justificada pelo período de adaptação e pelos mecanismos de exclusão competitiva do *Paenibacillus* sp. junto à microbiota intestinal, manifestando-se positivamente aos 42 dias.

O nível crescente de probiótico *Paenibacillus* sp. na ração induziu ao mesmo padrão de resposta em relação ao número de células de Kuppfer, proporcionando, provavelmente, melhor resposta imunológica da ave, devido à maior atividade fagocítica de micro-organismos, o que acarretou em manutenção da homeostase intestinal.

Aos 28 dias, o tratamento com probióticos favoreceu o aumento da atividade amilásica no pâncreas, corroborando com as respostas dos parâmetros morfométricos dos ácinos serosos, refletindo, consequentemente, em melhor metabolismo e maior aproveitamento de carboidratos da dieta resultando em melhor conversão alimentar na fase final.

5. REFERÊNCIAS

AFSHARMANESH, M.; SHARIF PAGHALEH, A.; KHEIRANDISH, R. Effects of sprouted and nonsprouted wheat and barley with and without enzyme on intestinal morphometry of broiler chickens. **Comp. Clin. Pathol**., v. 22, p. 993–998, 2013.

ALIAKBARPOUR, H.R.; CHAMANI, M.; RAHIMI, G.; SADEGHI, A.A.; QUJEQ, D. The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.,** v. 25(9), p. 1285-1293, 2012.

APATA, D.F. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus Bulgaricus*. **J. Sci. Food Agric**., v. 88, p. 1253-1258, 2008.

ASHRAF, S.; ZANEB, H.; YOUSAF, M.S.; IJAZ. A.; SOHAIL, M.U.; MUTI, S.; USMAN, M.M.; IJAZ, S.; REHMAN, H. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v. 97, p. 68-73, 2013.

BAI, S.P.; WU, A.M.; DING, X.M.; LEI, Y.; BAI, J.; ZHANG, K.Y.; CHIO, J.S. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. **Poult. Sci.,** v. 92, p. 663-670, 2013.

BAUMEL, J.J. **Handbook of Avian Anatomy:** Nomina Anatomica Avium, 2 ed. Cambridge: Berge, p. 779, 1993.

BAURHOO, B.; PHILLIP, L.; RUIZ-FERIA, C.A. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. **Poult. Sci**., v. 86, p. 1070-1078, 2007.

BEATTIE, L.; PELTAN, A.; MAROOF, A.; KIRBY, A.; BROWN, N.; COLES, M.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani* induced hepatic granulomas detects kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8+ T cells. **PLOS Pathog**., v. 6, n. 3, e:1000805, 2010.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: EDART, p. 239, 1976.

BERNFELD, P. Amylase α and β, In: COLOWICK, S.B.; KAPLAN, N.O. **Methods in enzymology.** New York: Academic Press, v. 1, p. 149-54, 1995.

BOMBA, A.; NEMCOVA, R.; GANCARCIKOVA, S.; HERICH, R.; GUBA, P. and MUDRONOVA, D. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. **Br. J. Nutr. Suppl.,** v. 1, p. 95-99, 2002.

BRADLEY, G.L.; SAVAGE, T.F.; TIMM, K.I. The effect of supplementing diets *Saccharomyces cerevisiae var, boulardii* on male poult performance and ileal morphology. **Poult. Sci.,** v. 73, p. 1766-1770, 1994.

CAVAZZONI. V.; ADAMI, A.; CSTRIVILLI, C. Performance of broiler chickens supplemented with Bacillus coagulans as probiotic. **Br. Poult. Sci**., v. 39, p. 526-529, 1998.

CHEN, W.; WANG, J.P.; YAN, L.; HUANG, Y.Q. Evaluation of probiotics in diets with different nutrient densities on growth performance, blood characteristics, relative organ weight and breast meat characteristics in broilers. **Br. Poult. Sci**., p. 1-7, 2013.

DORIGAN, C.F.; TOMAZ DE RESENDE, K.; ALESSI, A.C.; MALHEIROS, E.B.; SAKOMURA, N.K. Avaliação nutricional do feno das folhas da amoreira (*Morus alba* L.) em frangos de corte. **Maringá**. v. 33, n. 4, p. 353-358, 2011.

DUNNETT, C.W. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. **J. Am. Stat. Assoc**., v. 272, p. 1096-1121, 1955.

DUNNETT, C.W. New tables for multiple comparisons with a control. **Biometrics,** v. 20, p. 482-491, 1964.

FENG, J.; LIU, X.; XU, Z.R.; WANG, Y.Z.; LIU, J.X. Effects of fermented soybean meal on digestive enzyme activities and intestinal morphology in broilers. **Poult. Sci.,** v. 86. p. 1149-1154, 2007.

FU, T.L.; ZHANG, W.T.; ZHANG, L.; WANG, F.; GAO, Y.; XU, M. L-Arginine administration ameliorates serum and pulmonary cytokine response after gut ischemia–reperfusion in immature rats. **World J. Gastroenterol.,** v. 11, p. 1070–2, 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Applied. Bacterol**., v. 66, p., 365-378, 1989.

GEIER, M.S.; TOROK, V.A.; GUO, P.; ALLISON, G.E.; BOULIANNE, M.; JANARDHANA, V.; BEAN, A.G.D.; HUGHES, R.J. The effects of lactoferrin on the intestinal enviorenment of broiler chickens. **Br. Poult. Sci**., v. 52, p. 564-572, 2011.

GUNAL, M.; YAYLI, G.; KAYA, O.; KARAHAN, N.; SULAK, O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organism acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. **Int. J. Poult. Sci**., v. 5, n. 2, p. 149-155, 2006.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem**., v. 48, p. 422-427. 1972.

HASSANPOUR, H.; ZAMANI MOGHADDAM, A.K.; KHOSRAVI, M.; MAYAHI, M. Effects of symbiotic on the intestinal morphology and humoral immune response in broiler chickens. **Livest. Sci.,** v. 153, p. 116-122, 2013.

HERNÁNDEZ, F.; GARCÍA, V.; MADRID, J.; ORENGO, J.; CATALÁ, P.; MEGÍAS, M.D. Effect of formic acid on performance, digestibility, intestinal histomorphology and plasma metabolite levels of broiler chickens. **Brit. Poult. Sci**., v. 47, p. 50-56, 2006.

ICHIKAWA, H.; KUROIWA, T.; INAGAKI, A.; SHINEHA, R.; NISHIHIRA, T.; SATOMI, S. and SAKATA, T. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat, **Dig. Dis. Sci**., v. 44, p. 2119-2123, 1999.

JANG, I.; KANG, S.; KO, Y. Influence of Plum (*Prunus Mume Siebold* and *Zucc*.) products on growth performance, intestinal function and immunity in broiler chicks, **JPSA,** v. 50, p. 28-36, 2013.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Influence of dried *Bacillus subtilis* and *lactobacilli* cultures on intestinal microflora and performance in broilers. **Asian-Aust. J. Anim. Sci**., v. 9, p. 397-404, 1996.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth Performance. Intestinal Microbial Populations. and Serum Cholesterol of Broilers Fed Diets Containing Lactobacillus Cultures. **Poult. Sci.,** v. 77, p. 1259-1265, 1998.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplement with *Lactobacillus* cultures. **Poult. Sci**., v. 79, p. 886-891, 2000.

KAKADE, M.L.; RACKIS J.J.; MCGHEE, J.G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of improved procedure. **Cereal Chem***.,* v. 51, p. 376-82, 1974.

KARIMI TORSHIZI, M.A.; MOGHADDAM, A.R.; RAHIMI SH; MOJGANI, N. Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. **Brit. Poult. Sci**., v. 51, p. 178-184, 2010.

KHAMBUALAI, O.; YAMAUCHI, KOH-EN; RUTTANAVUT, J.; INCHAROEN, T.; KASHIMURA, J. Effect of Sugar Cane Extract, Commercial Probiotic and their Mixture on Growth Performance and Intestinal Histology in Broiler Chickens. **American J. Animal & Vet. Sci.,** v. 5, n. 2, p. 132-138, 2010.

KLAENHAMMER, T.R.; KLEEREBEZEM, M.; KOPP, M.V. and RESCIGNO, M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 12, p. 728-734, 2012.

LARSON, G. The normal microflora and glycosphingolipids. Pages 129-143 *in:* The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora, Wenner-Gren **International Symposium Series**., v. 52, GRUBB, R.; MIDTVEDT, T. and NORIN, E. ed, Stockton Press. New York, 1989.

LEV, R.; SPICER, S. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH, **J. Histoche. Cytoche.** Baltimore, v. 12, p. 309, 1964.

LIMA, A.C.F.; PIZAURO JR., J.M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E.B. Efeito do Uso de Probiótico sobre o Desempenho e Atividade de Enzimas Digestivas de Frangos de Corte. **R. Bras. Zootec.,** v.32, n.1, p. 200-207, 2003.

LINARI, G.; NENCINI, P.; NUCERITO, V. Cadmium inhibits stimulated amylase secretion from isolated pancreatic lobules of the guinea-pig. **Pharmacol. Res.,** v. 43, p. 219-223, 2001.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUD, J.J. **SAS for linear models,** 4 Ed. Cary, NC. SAS Institute, 2002.

LIU, J.R.; LAI, S.F.; YU, B. Evaluation of an intestinal Lactobacillus reuteri strain expressing rumen fungal xylanase as a probiotic for broiler chickens fed on a wheat-based diet. **Br. Poult. Sci.,** v. 48, n. 4, p. 507-514, 2007.

LUTFULLAH, G.; AKHTAR, T.; AHMAD, I.; KHATTAK, M.M.A.K.; DURRANI, F.E.; QURESHI, M.S. Effects of probiotic on the intestinal morphology with special reference to the growth of broilers. **J. Chem. Soc. Pak**., v. 33, p. 129-133, 2011.

McMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology,** Baltimore, v. 23, p. 99-108, 1948.

MAHMOOD, S.; KHAN, A.M.; SAWAR, M.; NISA, M. Use of chemical treatment to reduce antinutritional effects of tannins in salseed meal: Effect on performance and digestive enzymes of broilers. **Livest. Sci.,** v. 116, p. 162-170, 2007.

MATUR, E.; ULKER, C.; ARSLAN, M.; ELIF, E.; AKYAZI, I.; EVREN, E. The effects of *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on the development of pancreas and small intestine and on activity of pancreatic digestive enzymes in broiler chickens. **Arch. Geflügelk**., v. 71, p. 162-168, 2007.

MILES, R.D.; BUTCHER, G.D.; HENRY, P.R. and LITTELL, R.C. Effect of Antibiotic Growth Promoters on Broiler Performance, Intestinal Growth Parameters, and Quantitative Morphology. **Poult. Sci**., v. 85, p. 476–485, 2006.

MOUNTZOURIS, K.C.; TSITRSIKOS, P.; PALAMIDI, I.; ARVANITI, A.; MOHNL, M.; SCHATZMAYR, G.; FEREGOS, K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. **Poult. Sci**., v. 89, p. 58-67, 2007.

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

MUTUS, R.; KOCABAGLI, N.; ALP, M.; ACAR, N.; EREN, M.; GEZEN, S.S. The Effect of Dietary Probiotic Supplementation on Tibial Bone Characteristics and Strength in Broilers. **Poult. Sci.,** v. 85, p. 1621-1625, 2006.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.P.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 31, p. 1565-1573, 1998.

PAUL, S.K.; SAMANTA, G.; HALDER, G.; BISWAS, P. Effect of a combination of organic acid salts as antibiotic replacer on the performance and gut health of broiler chickens. **Livest. Res. Rural Dev.,** v. 19, n. 11, 2007.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; FIGUEIREDO, D.F.; BOIAGO, M.M.; CARVALHO, S.R.; BORDON, V.F. Intestinal mucosa development in broiler chicken fed natural growth promoters. **Braz. J. Poult. Sci**., v. 7, p. 221-229, 2005.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; FIGUEIREDO, D.F.; AMARAL, C.M.C. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. **Braz. J. Poult. Sci**., v. 9, p. 173-180, 2007.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; GROOT, B.C.F.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.R.P.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data**. J. Antimicrob. Chemothe.,** v. 53, p. 28–52, 2004.

PINHEIRO, D.F.; CRUZ, V.C.; SARTORI, J.R.; VICENTINI, P.M.L.M. Effect of early feed restriction and enzyme supplementation on digestive enzyme activities in broilers. **Poult. Sci.,** v. 83, p. 1544-1550, 2004.

POLLMANN, M.; NORDHOFF, M.; POSPISCHIL, A.; TEDIN, K. and WIELER, L.H. Effects of a probiotic strain ofEnterococcus faecium on the rate of natural Chlamydia infection in swine. **Infect. Immun.,** v. 73, p. 4346-4353, 2005.

PRIYANKARAGE, N.; SILVA, S.S.P.; GUNARATNE, S.P.; PALLIYAGURU, M.W.C.D.; WEERASINGHE, W.M.P.B.; FERNANDO, P.S. Comparison of the efficacies of different probiotics for broiler chickens. **Brit. Poult. Sci**., v. 44, p. 42-43, 2010.

RADECKI, S.V.; KU, P.K.; BENNINK, M.R.; YOKOYAMA, M.T.; MILLER, E.R. Effect of dietary copper on intestinal mucosa enzyme activity, morphology, and turnover rates in weanling pigs. **J. Anim. Sci.,** v. 70, p. 1424-1431, 1992.

RAJPUT, N.; MUHAMMAD, N.; YAN, R.; ZHONG, X.; WANG, T. Effect of dietary supplementation of curcumin on growth performance. intestinal morphology and nutrients utilization of broiler chicks. **Poult. Sci**., v. 50, p. 44-52, 2013a.

RAJPUT, I.R.; LI, L.Y.; XIN, X.; WU, B.B.; JUAN, Z.L.; CUI, Z.W.; YU, D.Y.; LI, W.F. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. **Poult. Sci.,** v. 92, p. 956-965, 2013b.

REISINGER, N.; GANNER, A.; MASCHING, S.; SCHATZMAYR, G.; APPLEGATE, T.J. Efficacy of a yeast derivation broiler performance, intestinal morphology and blood profile**. Livest. Sci.,** v. 143, p. 195-200, 2012.

RISHI, P.; BHARRHAN, S.; SINGH, G.; KAUR, I.P. Effect of Lactobacillus plantarum and L-arginine against endotoxin-induced injury in a rat model. **Life Sci.,** v. 89, p. 847-853, 2011.

RODRÍGUEZ-LECOMPTE, J.C.; YITBAREK, A.; BRADY, J.; SHARIF, S.; CAVANAGH, M.D.; CROW, G.; GUENTER, W.; HOUSE, J.D.; CAMELO-JAIME, G. The effect of microbial-nutrient interaction on the immune system of young chicks after early probiotic and organic acid administration. **J. Anim. Sci**., v. 90, p. 2246-2254, 2012.

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, 3ª edição. Ed: Rostagno, H, s, **UFV-Departamento de Zootecnia**. Viçosa-MG, 2011.

SAKI, A.A.; HEMATTI MATIN, H.R.; ZAMANI, P.; TABATABAI, M.M.; VATANCHIAN, M. Various ratios of pectin to cellulose affect intestinal morphology, DNA quantitation, and performance of broiler chickens. **Livest. Sci.,** v. 139, p. 237-244, 2011.

SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. **Comp. Biochem. Physiol**. Part A: v. 133, p. 95-104, 2002.

SAMLI, H.E.; SENKOYLU, N.; KOC, F.; KANTER, M.; AGMA, A. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and microbiota. **Arch. Anim. Nutr**., v. 61, p. 42-49, 2007.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **J. Appl. Poult. Res.,** v. 10, p. 236-244, 2001.

SAS INSTITUTE INC**. SAS System for Microsoft Windows.** SAS Institute Inc., Campus Drive, Cary, NC. USA. 2011.

SHAMS SHARGH, M.; DASTAR, B.; ZEREHDARAN, S.; KHOMEIRI, M.; MORADI, A. Effects of using plant extracts and a probiotic on performance, intestinal morphology, and microflora population in broilers. **J. Appl. Poult. Res.,** v. 21, p. 201-208, 2012.

SIEO, C.C.; ABDULLAH, N.; TAN, W.S.; HO, Y.W. Influence of *β*-Glucanase-Producing *Lactobacillus* Strains on Intestinal Characteristics and Feed Passage Rate of Broiler Chickens. **Poult. Sci.,** v. 84, p. 734-741, 2005.

SINOL SEM; INGALE, S.L.; KIM, J.S.; KIM, K.H.; LOHAKARE, J.D.; KIM, E.K.; KIM, E.K.; RYU, M.H.; KWON, I.K.; CHAE, B.J. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Re. Vet. Sci.,** v. 93, p. 264-268, 2012.

SMIRNOV, A.; PEREZ, R.; AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. **J. Nutr.,** v. 135, p. 187-192, 2005.

SOLIS de los SANTOS, F.; DONOGHUE, A.M.; FARNELL, M.B.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; DONOGHUE D.J. Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poults supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (alphamune). **Poult. Sci.,** v. 86, p. 921-930, 2007.

STANLEY, V.G.; OJO, R.; WOLDESENBET, S.; HUTCHINSON, D.; KUBENA, L.F. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poult. Sci.,** v. 72, p. 1867-1872, 1993.

SUN, X.; MCELROY, A.; WEBB, JR., K.E.; SEFTON, A.E.; NOVAK, C. Broiler Performance and Intestinal Alterations when Fed Drug-Free Diets**. Poult. Sci.,** v. 84, p. 1294-1302, 2005.

TAHERI, H.R.; MORAVEJ, H.; MALAKZADEGAN, A.; TABANDEH, F.; ZAGHARI, M.; SHIVAZAD, M.; ADIBMORADI, M. Efficacy of *Pediococcus acidlactici*-based probiotic on intestinal Coliforms and villus height, serum cholesterol level and performance of broiler chickens. **Afr. J. Biotechnol.,** v. 9, n. 4, p. 7564-7567, 2010.

TEO, A.Y.; TAN, H.M. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). **J. Appl. Poult. Res.,** v. 16, p. 296–303, 2007.

TSIRTSIKOS, P.; FEGEROS, K.; BALASKAS, C.; KOMINAKIS, A.; MOUNTZOURIS, K.C. Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. **Poult. Sci.,** v. 91, p. 1860-1868, 2012.

União Brasileira de Avicultura, 2008. Protocolo de Bem-Estar para Frangos e Perus. São Paulo. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Bem estar-animal/Protocolo%20de%20Bem-Estar%20Frangos%20e%20Perus.pdf. Acesso em: 13 Fev. 2014.

YANG, C.M.; CHEN, A.G.; HONG, Q.H.; LIU, J.X.; LIU, J.S. Effects of cysteamine on growth performance, Digestive enzyme activities and metabolic hormones in broilers. **Poult. Sci.,** v. 85, p. 1912-1916, 2006.

YANG, Y.; IJI, P.A. and CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World Poult. Sci. J.,** v. 65, p. 97-114, 2009.

YAZDANI, A.; POORBAGHI, S.L.; HABIBI, H.; NAZIFI, S.; RAHMANI, F.; SEPEHRIMANESH, M. Dietary *Berberis vulgaris* extract enhances intestinal mucosa morphology in the broiler chicken (*Gallus gallus*). **Comp. Clin. Pathol.,** v. 22, p. 611-615, 2013.

ZHANG, X.; CAO, F.; SUN, Z.; YU, W.; ZHAO, L.; WANG, G.; WANG, T. Effect of feeding *Aspergillus niger*-fermented Ginkgo biloba-leaves on growth, small intestinal structure and function of broiler chicks. **Livest. Sci.,** v. 147, p. 170-180, 2012.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE DOIS PROBIÓTICOS (*Paenibacillus* sp. *e Bacillus subtilis*), ÁCIDO CÍTRICO e LINCOMICINA SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL, HEPÁTICA E PANCREÁTICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PÂNCREAS EM FRANGOS DE CORTE

Resumo - Ácidos orgânicos e probióticos são considerados aditivos alternativos aos antibióticos promotores de crescimento. Seus mecanismos de ação e eficácia são variáveis e poderiam ser melhor compreendidos. O objetivo do experimento foi de avaliar o efeito da adição de dois probióticos (*Paenibacillus* sp. e *Bacillus subtilis*), ácido cítrico e lincomicina no desempenho, morfometria intestinal, do fígado e pâncreas e atividade pancreática em frangos de corte. Foram utilizados 400 pintinhos machos Ross 308 e distribuidos em 20 boxes com cama reutilizada e alimentados com uma dieta à base de milho e farelo de soja (DB) contendo salinomicina. Os cinco tratamentos avaliados foram controle negativo (CN) sem aditivos, controle positivo com lincomicina (CP), ácido cítrico, *Paenibacillus* sp. e *Bacillus subtilis* (GalliPro®). Para os parâmetros de desempenho foram avaliados o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) corrigido pela mortalidade na fase inicial (1 a 21 d), crescimento (22 a 35 d) e final (36 a 42 d) e todo o período de criação de 1 a 42 e 1 a 49 dias de idade. Aos 14, 28 e 42 dias de idade amostras de intestino de uma ave por boxe foram coletadas e avaliou-se o comprimento, largura, densidade e número de células caliciformes do duodeno, jejuno e íleo. Aos 28 e 42 dias de idade, foram avaliadas a amilase, tripsina e quimotripsina pancreática. Os dados foram analisados num delineamento inteiramente casualizado (DIC) com contrastes ortogonais contra o controle positivo e negativo respectivamente. Não houve efeitos (P>0,05) entre os tratamentos para o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar em todas as fases avaliadas nem durante o período total de criação, exceto para conversão alimentar na fase final que foi melhor (P<0,05) no controle positivo que o controle negativo. Isto indica que todos os aditivos não melhoraram o desempenho em comparação ao controle negativo. A morfometria das vilosidades foi afetada (P<0,05) pelos tratamentos durante a fase inicial. Frangos de corte alimentados com dieta contendo *Paenibacillus* sp. tiveram maior largura de vilosidades que o controle positivo. O comprimento das vilosidades foi menor em aves tratadas com *Paenibacillus* sp. e ácido cítrico. Os frangos tratados

com ácido cítrico tiveram maior número de células caliciformes no duodeno e jejuno aos 14 e 28 dias de idade. Os tratamentos não influenciaram (*P*>0,05) a atividade enzimática do pâncreas.

Palavras-chave: ácido orgânico, células hepáticas, enzimas pancreáticas, densidade e vilosidade.

EFFECTS OF TWO PROBIOTICS (*Paenibacillus* sp. *e Bacillus subtilis*) CITRIC ACID and LINCOMYCIN ON PERFORMANCE AND GUT, LIVER AND PANCREAS MORPHOMETRIC AND PANCREATIC ENZYMES ACTIVITY ON BROILERS

Summary - Acidifiers and probiotics are considered alternative feed additives (FA) for growth promotant antibiotics. Their mechanisms of action and efficacy are variable and should be better understood. One experiment aimed to evaluate the effects of the dietary addition of two probiotics (*Paenibacillus* sp. and *Bacillus*) and citric acid on broiler performance, intestinal, hepatic and pancratic morphometrics and pancreatic enzyme activity. Four hundred d-old male Ross 308 chicks were placed in 20 floor pens with reused litter and fed common corn-soybean basal diets (BD) that contained salinomycin. The five treatments evaluated were a negative control (NC) without FA, a positive control with lincomycin (PC), citric acid, *Paenibacillus* sp. and *Bacillus subtilis* (GalliPro®). BW, feed intake (FI) and FCR corrected by mortality were evaluated at starter (1-21d), grower (22-35d) and finisher (36-42d) phases and the whole grow out. At 14, 28 and 42d intestinal samples of one chicken per pen were collected to evaluate villi height and width and goblet cells in the duodenum, jejunum and ileum. At 28 and 42d of age, pancreatic amylase, trypsin and chymotrypsin activities were evaluated. Data were analyzed in a CRD with orthogonal contrasts against the positive control. No significant effects (P>0.05) of treatments were observed on BWG, FI or FCR in all phases evaluated or the whole grow out, except that FCR in the finisher phase was better (P<0.05) in the PC than the NC. This indicates that all FA did not improve live performance compared to the NC. Villi morphometrics was affected (P<0.05) by treatments during the starter phase. Broilers fed diets containing *Paenibacillus* sp. had wider villi than broilers from the PC. Villi height was decreased by *Paenibacillus* sp. and citric acid. Citric acid increased the number of goblet cells in the duodenum and jejunum at 14 and 28d. Treatments did not affect (P>0.05) pancreatic enzyme activity.

Keywords: Organic acid, hepatic cells, pancreatic enzymes, density, and villi.

1. INTRODUÇÃO

O promotor de crescimento é um microbiano administrado durante um período de tempo (aditivo nutricional) para melhorar o crescimento animal. A era dos antibióticos promotores de crescimento (APC) começou em 1946 com as melhores respostas em crescimento com o uso de estreptomicina em frangos de corte, desde então, os antibióticos tem sido usados como aditivo no alimento ou água na produção de animais (aves, suínos e ruminantes) ao longo de décadas, trazendo benefícios como manutença na saúde animal, altos níveis de produção e redução de agentes patógenos de origem animal (MATHEW et al., 2007). Embora alguns sejam usados terapeuticamente para favorecer a saúde e bem-estar dos animais, a maioria é utilizada com fins profiláticos para promover aumento na taxa de crescimento e eficiência alimentar (APC). Esta interação com a microbiota intestinal resulta em melhor digestão, absorção e metabolismo de nutrientes como carboidratos, proteínas, aminoácidos, minerais e vitaminas. Além de melhor aproveitamento dos alimentos, menor uso de ingredientes na ração e perdas nas excretas.

O uso generalizado dos antibióticos tem gerado uma preocupação crescente em relação a de micro-organismos resistentes (SWARTZ, 2002; THRELFALL, 2002). Esta situação é vivenciada pelos consumidores, e, também está relacionada com pressões políticas, tem resultado numa proibição no uso (APC). Entendendo como resistência, as concentrações mínimas inibitórias (CMI), há evidências de que genes de resistência aos antibióticos podem ser ou são transmitidos para bactérias anteriormente sensíveis, sendo ameaça à saúde humana e animal (MONTAGNE et al. 2003). O uso inapropriado dos antibióticos tem sido definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como: dosagem inadequada, sobre ou sub prescrição, escolha incorreta da droga, incorreta duração do tratamento, desnecessária utilização de medicamento (WHO, 2001). Desde 2006, todos os promotores de crescimento tem sido proibidos na União Europeia, regulamento (Nº 1831/2003). Por tanto, o uso de antibióticos na pecuária está sendo reduzindo como já demostrado por Dinamarca, Suécia e Suíça.

Por estas circunstâncias, tem sido realizadas cada vez mais investigações sobre probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas e fitoterápicos na

alimentação animal, na diminuição da carga de patógenos, melhora da saúde intestinal (exclusão competitiva) e na formação de metabolitos secundários para um melhor desempenho do animal. Enquanto os probióticos e prebióticos podem ser usados em simbiose, os probióticos tem demonstrado alto potencial como alternativa aos antibióticos, Independente do motivo pelo qual as bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos ou o fato que o uso de APC aumenta o desenvolvimento da resistência, deve-se encontrar estratégias alimentares alternativas para manter o desempenho similar quando com APC. O objetivo do experimento foi de avaliar o efeito da adição de dois probióticos (*Paenibacillus* sp. e *Bacillus subtilis*), ácido cítrico e lincomicina na alimentação de frangos de corte no desempenho, morfometria intestinal, do fígado e pâncreas e atividade pancreática em frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aves e manejo

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal/SP. Todas as práticas relacionadas ao projeto de estudo foram aprovadas pela Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, protocolo Nº 014237/13. O galpão usado foi tipo túnel com cortinas laterais e exaustores. Foram utilizados 20 parcelas com 20 aves cada, totalizando 400 pintinhos de corte machos da linhagem Ross 308 procedentes de incubatório comercial, criados de um até os 49 dias de idade distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado.

A cama foi reutilizada, sendo cama de terceiro uso misturada com cama de matrizes de um ano de uso, a qual não teve nenhum tipo de tratamento prévio, composta de maravalha e distribuida de modo que todos os tratamentos tiveram a mesma quantidade inicial deste material. Nas duas primeiras semanas de idade das aves, utilizaram-se nipples e comedouros tubulares infantis os quais foram substituídos gradativamente por comedouros tubulares com capacidade para 20 kg

de ração, após a primeira semana de idade. O programa de luz e temperatura foi feito segundo protocolo de Bem-Estar para frangos e Perus, UBA (2008), o aquecimento foi através de lâmpadas infravermelho de 250 watts. Foi registrada diariamente a temperatura ambiente e umidade relativa do ar (manhã e noite), utilizando-se termohigrômetros digitais distribuídos em três pontos do galpão aproximadamente a 10 cm da cama.

As rações experimentais foram isoproteicas e isoenergéticas dentro de cada fase de criação: inicial (1 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 35 dias de idade) e final (36 a 49 dias de idade) e foram formuladas seguindo a composição de ingredientes e os níveis nutricionais indicados por (ROSTAGNO et al*.,* 2011) (Tabela 1). A ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante o período de criação. Os pintinhos foram vacinados contra a doença de Marek, Gumboro e Bouba Aviária no incubatório, seguindo-se da vacinação no 7º e 21º dias de idade contra a doença de Gumboro e no 7º dia de idade contra a doença de Newcastle. As vacinas foram realizadas durante o período experimental via água de bebida, utilizando leite em pó como veículo (2g/L).

2.2. Delineamento experimental e tratamentos

2.2.1. Análise estatística

2.2.1.1. Análise de variância

O análise de variância incluiu cinco tratamentos e quatro repetições e utilizando-se o procedimento GLIMMIX do SAS Versão 9,3 (SAS, 2011). Usou-se o teste de Dunnett ao 5% de significância e da média dos mínimos quadrados (LSMEAN) para comparação de medias dos tratamentos com o controle positivo. Para as variáveis que tiveram várias medições em cada repetição usou-se a repetição como fator residual randomizado.

Testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros estudentizados (teste de Cramer-Von-Mises) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe) (LITTELL et al., 2002). A diferença mínima significativa (LSD) foi calculada

usando os efeitos dos erros padrão que foi considerado significativo nas análise de variância (*P*<0,05) nível de probabilidade. (DUNNETT, 1955, 1964).

Os tratamentos foram os seguintes:

- T1: Controle positivo (lincomicina, 20g/t);
- T2: Dieta controle sem aditivo;
- T3: 30 ppm/t de probiótico género *Paenibacillos* sp.*;*
- T4: Ácido cítrico, (150g/t)*;*
- T5: GalliPro® (*Bacillus subtilis,* 1kg/t);

2.3. Desempenho das aves

Foram avaliadas como características de desempenho, o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar (kg ração/kg peso) durante todas as fases e o ciclo completo de criação, neste último foram avaliados os parâmetros de viabilidade e o índice de eficiência produtiva.

O ganho de peso (GP) foi obtido pela diferença entre o peso ao final de cada período e o peso inicial no alojamento, ou no início de cada período. O consumo de ração (CR) foi calculado pela diferença entre o total de ração fornecida e as sobras de ração no final de cada período, corrigidos pelo número das aves mortas. A conversão alimentar (CA) foi calculada pela razão entre o total de ração fornecida e o ganho de peso no período, e corrigida pelo número das aves mortas.

2.4. Morfometria intestinal, hepática e pancreática

2.4.1. Coleta de amostras para análise do intestino delgado

Para as análise histológicas do intestino, aproximadamente dois centímetros da porção média do duodeno, jejuno e íleo de 4 aves por tratamento, foram coletadas aos 14, 28 e 42 dias de idade e armazenados em frascos com solução de Bouin. Após de 24 horas, os fragmentos foram seccionados transversalmente imersos em álcool etílico a 70% para remoção do fixador e desidratadas em séries crescentes de álcoois

(70%, 80%, 90%, 95% e Absoluto I, II, III), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A seguir, foram realizados de cada bloco histológico, quatro cortes semiseriados de sete *µm* de espessura com intervalo de dez depreciações, de cada animal, para os cinco tratamentos dispostos sob as lâminas histológicas, totalizando 180 blocos (3 órgãos x 3 idades x 4 aves x 5 tratamentos), posteriormente corados segundo a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (BEHMER et al., 1976).

Para a determinação das células caliciformes foi usado o método de coloração pelo Periodic Acid Schiff (PAS), para detecção de mucinas neutras, ou Alcian Blue (AB) pH 2,5, para detecção de mucinas ácidas, segundo (McMANUS, 1948 e LEV e SPICER, 1964). Posteriormente, o material foi acondicionado em caixas histológicas numeradas de acordo com os tratamentos. As lâminas devidamente coradas foram analisadas ao microscópio óptico. A nomenclatura anatômica utilizada foi a de (BAUMEL, 1993). As 720 (180 blocos x 4 cortes) imagens pertinentes à avaliação morfométrica foram capturadas com o auxílio da microcâmera *Olympus DP 11* acoplada ao microscópio e armazenadas em um cartão de memória. As imagens, de interesse, do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) das aves foram descarregadas em um microcomputador e analisadas com o auxílio do software *Image Plus, Media Cybernetics*, Brasil, versão 4.1. As características morfométricas do duodeno, jejuno e íleo avaliadas incluíram o comprimento, a largura, o número de vilosidades e número de células caliciformes.

2.4.2. Coleta de amostras do fígado e pâncreas

Para análise dos parâmetros morfométricos do fígado e pâncreas, quatro aves de cada tratamento foram sacrificadas aos 14, 28 e 42 dias de idade. Foram extraídas amostras de aproximadamente dois cm^2 do pâncreas e do lobo esquerdo do fígado e fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Posteriormente foram lavadas em álcool 70% para retirada do fixador e desidratadas em série crescente de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A seguir, foram realizados de cada bloco histológico, quatro cortes histológicos de sete µm de espessura, de cada animal, para os cinco tratamentos utilizados e colocados nas lâminas histológicas totalizando 120

blocos (2 órgãos x 3 idades x 4 aves x 5 tratamentos) realizando cortes histológicos semi seriados com intervalo de dez depreciações com espessura de sete µm, posteriormente corados segundo a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (BEHMER et al., 1976). Em relação aos parâmetros hepáticos foi analisado o número de células de Kupffer do fígado. Com relação aos parâmetros pancreáticos foram medidas a área, diâmetro e perímetro das ilhotas de Langerhans e dos ácinos serosos.

2.5. Atividade enzimática

Os pâncreas foram coletados, pesados, identificados, acondicionados em papel alumínio, congelados e transportados em nitrogênio líquido para o laboratório, onde foram armazenados em freezer a -70°C. No laboratório de enzimologia aplicada (LEA), os pâncreas foram descongelados, o tecido adiposo aderente ao pâncreas removido, e, uma amostra do tecido foi moída, homogeneizada (Omni-GLH) em tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 contendo $CaCl_2$ 50 mM na proporção de 1:20 (peso:volume) e centrifugada a 14.000g por 30 minutos sob refrigeração a 4ºC, filtrado em lã de vidro, do material filtrado foram retiradas alíquotas, congeladas e armazenadas à -70ºC.

A concentração de proteína foi determinada utilizando-se soroalbumina bovina fração V como padrão, através do método de Lowry modificado por (HARTREE, 1972). A atividade da α-amilase foi determinada a 37ºC, dosando-se a maltose liberada, a 530 nm (BERNFELD, 1955). Uma unidade de atividade enzimática (U) da α-amilase pancreática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de maltose/minuto/mg de proteína nas condições padrões do teste.

Uma vez ativado o tripsinogênio, a atividade da tripsina foi determinada descontinuamente a 37 ºC, por meio da liberação da p-nitroanilida ($\in$= 9620 M^{-1} cm^{-1}) a 410 nm (KAKADE et al., 1974). A atividade da quimotripsina foi determinada a 37 ºC, através da liberação da p-nitroanilida ($\in$= 8800 M^{-1} cm^{-1}) a 410 nm (ERLANGER et al., 1966). Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo 1 nmol de p-nitroanilida

liberada por minuto/mg de proteína nas condições do teste. Usou-se um espectrômetro HITACHI U-2000.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeitos (P>0,05) entre os tratamentos para as variáveis, consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) para as fases inicial (1 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 35 dias de idade) assim como as fases de 1 a 42 e 1 a 49 dias de idade, respectivamente encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Não foi observada diferença (P>0,05) com a suplementação de probióticos (*Paenibacillus* sp. e *B. subtilis*) e ácido cítrico sobre o controle positivo (lincomicina) e negativo, em todas as características de desempenho avaliadas (Tabelas 1 e 2). Exceto, as aves do grupo controle negativo apresentaram (P<0,05) a pior conversão alimentar durante a fase final (2,087).

Estes resultados de desempenho também estão de acordo com evidências de outros autores que não observaram diferenças entre aditivos (probióticos, prebióticos, etc.) e o uso de antibióticos, como por exemplo, Vukic Vranjes e Wenk (1995), que não encontraram diferenças entre o uso de enzimas (*Trichoderma viride*, cellulase, glucanase, xilanase, amilase e pectinase) e avoparcina, talvez porque os efeitos dos aditivos se expressam mais em condições de maior desafio. Teo e Tan (2007) que usaram *Bacillus subtilis*, e, Khambualai et al. (2010) que trabalharam com *Leuconostoc* sp. *Pichia* sp. e *Bacillus subtilis*, e, Afsharmanesh et al. (2013), que testaram o prebiótico *Aspergillus mycelium* o probiótico GalliPro® (*Bacillus subtilis*), não observaram diferenças com o virginiamicina. Dados similares foram observados por Mountzouris et al. (2007, 2010), ao usar (*Lactobacillus reuteri* DSM 16350, *Enterococcus faecium* DSM 16211, *Bifidobacterium animalis, DSM 16284, Pediococcus acidilactici DSM 16210, e Lactobacillus salivarius DSM 16351*) na ração de frangos, não observaram diferenças com o controle positivo (avilamicina) o que nos demonstra a eficiência do uso de probióticos como melhoradores de desempenho. Priyankarage et al. (2003) não encontraram efeitos positivos de probióticos sobre as características de desempenho em frangos de corte.

Por outro lado, Kabir et al. (2004) que demonstraram aumento do ganho de peso em frangos alimentados com probióticos (*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobaterium bifidum, Streptococcus thermophilus, Enterococcus faecium, Aspergillus oryzae* e *Candida pintolopessi,*). Outros autores, Paul et al. (2007) e Rajput et al. (2013) observaram melhor desempenho em aves tratadas com a adição de ácidos orgânicos (formato de amônio, propionato e lactato de cálcio) e *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus subtilis* B10, respectivamente em relação as aves alimentadas com virginiamicina.

Muitos efeitos de melhoradores de desempenho na digestão de alimentos estão bem documentados, isto depende de muitos fatores como o tipo, características das cepas, forma de administração, etc. Onde uma melhora da digestão pode ser explicada pelo uso destes probióticos. Os antibióticos tem propriedades antibaterianas e ajudam na redução de patógenos, contudo, trazem efeitos benéficos no desempenho. A falta de efeitos no desempenho do probiótico *Paenebacillus* sp., *B. subtillis* e ácido cítrico pode ser associada às condições do meio ambiente (cama reutilizada não teve suficiente desafio). Os resultados destes estudo sugerem que probióticos e ácido cítrico podem ser usados como substitutos dos antibióticos e agir como melhoradores de desempenho em frangos de corte.

Tabela 1. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte machos na fase de 1 a 21, 22 a 35 e 36 a 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	1 a 21 dias				22 a 35 dias				36 a 42 dias			
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	V (%)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	V (%)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	V (%)
CP	1,118	0,807	1,39	100	2,179	1,228	1,78	98	1,348	0,690	1,96	95
CN	1,100	0,789	1,39	100	2,181	1,245	1,75	99	1,343	0,672	2,08^{x}	96
30	1,111	0,798	1,39	99	2,213	1,291	1,71	96	1,353	0,666	2,03	95
Ácido cítrico	1,055	0,798	1,332	100	2,164	1,277	1,69	98	1,369	0,684	2,00	95
GalliPro®	1,139	0,777	1,43	99	2,212	1,274	1,74	96	1,374	0,682	2,02	95
Teste F	1,89	0,78	3,04	0,87	0,15	1,42	0,51	0,75	0,32	0,15	1,95	0,68
Valor P	0,168	0,557	0,068	0,51	0,962	0,286	0,730	0,920	0,861	0,961	0,158	0,970
CV%	1,93	1,61	1,39	0,58	2,72	1,73	2,56	2,66	1,93	3,68	1,63	3,91

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Tabela 2. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte machos na fase de 1 a 42 e 1 a 49 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	1 a 42 dias				1 a 49 dias			
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	VC (%)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	VC (%)
CP	4,386	2,700	1,63	96	5,715	3,348	1,71	95
CN	4,375	2,694	1,63	96	5,722	3,329	1,72	95
30	4,442	2,704	1,64	99	5,773	3,399	1,70	95
Ácido cítrico	4,394	2,709	1,62	98	5,731	3,354	1,71	98
GalliPro®	4,491	2,682	1,67	99	5,890	3,368	1,75	99
Teste F	0,84	0,10	1,10	0,16	0,53	0,32	0,86	0,84
Valor P	0,35	0,98	0,40	0,93	0,72	0,86	0,52	1,32
CV%	1,915	1,389	1,276	3,587	2,332	1,371	1,712	5,225

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Parâmetros morfométricos

O efeito da adição de probióticos e ácido cítrico na resposta dos parâmetros morfométricos e estatísticos do intestino delgado das aves com 14, 28 e 42 dias de idade são apresentadas nas Tabela 3, 4, 5 e 6.

Comprimento das vilosidades do intestino

O efeito dos tratamentos sobre a morfologia nos diferentes segmentos do intestino delgado em frangos de corte aos 14, 28 e 42 dias de idade é apresentado na Tabela 3.

Houve efeito (P<0,05) dos tratamentos para o comprimento do duodeno (CD) aos 14 dias e do íleo (CI) aos 14 e 28 dias de idade. Aos 14 dias de idade, o comprimento das vilosidades do duodeno foi maior (P<0,05) em frangos alimentados com a dieta controle positivo (lincomicina) em comparação com as dietas com ácido cítrico e probiótico 30 ppm do *Paenibacillus* sp. No entanto, o comprimento das vilosidades do íleo foi maior (P<0,05) nas aves tratadas com ácido cítrico em relação ao controle positivo. Para as demais fases de criação não houve efeito (P>0,05) sobre o grupo controle positivo (lincomicina) para o comprimento das vilosidades do intestino.

Autores como Sun et al. (2005) e Tsirtsikos et al. (2012) não encontraram diferenças no comprimento das vilosidades intestinais quando avaliaram prebióticos, probióticos e antibióticos como lincomicina e avilamicina respectivamente. Assim Sharifi et al. (2012), não encontraram diferenças no jejuno e íleo aos 40 dias em dietas formuladas com (*Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus delbrueckii sp. Bulgaricus*; *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium bifidum*; *Streptococcus salivarius* sp. *Thermophilus*; *Enterococcus faecium*; *Aspergillus oryzae* e *Candida pintolopesii*) e flavomicina.

No entanto, maiores vilosidades foram observadas após o uso probióticos *(Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Aspergillus orizea, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, Candida pintolepesii)* e flavomicina como antibiótico (GUNAL et al., 2006). Hernández et al. (2006)

encontraram diferenças das vilosidades do jejuno quando os frangos foram arraçoados com ácido fórmico e avilamicina.

A estrutura da mucosa do intestino delgado está relacionada com a saúde intestinal. Nossos resultados podem serem explicados levando-se em conta que a quantidade de micro-organismos do probiótico não foi suficiente para gerar sinergia junto com a microbiota intestinal na formação de metabólitos secundários como ácidos graxos de cadeia curta. Sakata et al. (1999), observaram um incremento de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) quando utilizaram probióticos em condições in vitro.

Tabela 3. Valores médios do comprimento do duodeno (CD), do jejuno (CJ) e do íleo (CI) do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	14 dias (*µm*)			28 dias (*µm*)			42 dias (*µm*)		
	CD	CJ	CI	CD	CJ	CI	CD	CJ	CI
CP	532,69	345,55	273,17	1248,48	1135,40	783,66	1374,93	1276,98	1130,47
CN	518,41	376,39	278,26	1457,00	1126,54	918,46	1458,13	1168,37	987,53
30	462,22^{x}	422,55	296,38	1246,34	1027,43	877,55	1531,88	1174,03	1045,15
Ácido cítrico	443,26^{x}	342,25	352,57^{x}	1416,13	931,81	695,06	1590,62	1249,08	865,24
GalliPro®	556,59	366,04	269,47	1332,08	965,90	737,57	1630,88	1404,24	1020,28
Teste F	7,31	1,07	6,56	1,08	0,65	2,70	1,10	3,47	1,03
Valor P	0,0032	0,4035	0,0049	0,4084	0,6392	0,0847	0,3902	0,0418	0,4243
CV%	4,75	8,47	4,82	7,58	11,29	8,62	6,47	5,08	9,50

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Largura das vilosidades do intestino delgado

As medidas da largura das vilosidades intestinais dos frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, submetidos a probióticos e ácido cítrico encontram-se na Tabela 4.

Houve um incremento (P<0,05) da largura das vilosidades em aves alimentadas com 30 ppm do probiótico *Paenibacillus* sp. (jejuno e íleo) e ácido cítrico (íleo) aos 14 dias de idade. No entanto as aves tratadas com o ácido cítrico apresentaram menor (P<0,01) largura das vilosidades do duodeno aos 14 dias e jejuno aos 28 dias de idade que o grupo controle positivo (lincomicina). Aos 42 dias de idade não deferiu (P>0,05) a largura das vilosidades do intestino em nenhuma das três seções avaliadas.

Gunal et al. (2006), não encontraram diferenças na largura das vilosidades intestinais em dietas com flavomicina, probiótico à base de (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Aspergillus orizea, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, Candida pintolepesii*) e Genex (ácido propiônico e fôrmico, extrato de plantas, óleos essenciais e sais minerais). Assim mesmo, Sharifi et al. (2012), que ao testar probióticos (*Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus delbrueckii* sp*. Bulgaricus*; *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium bifidum*; *Streptococcus salivarius* sp. *Thermophilus*; *Enterococcus faecium*; *Aspergillus oryzae* e *Candida pintolopesii*) não detectaram diferenças na largura do duodeno, jejuno e íleo aos 40 dias de idade. Frangos alimentados com (*Bacillus subtilis* e *Aspergillus mycelium*) não apresentaram diferenças no grupo controle tratado com virginiamicina (AFSHARMANESH et al., 2013). Por outro lado, Salim et al. (2013) encontraram diferenças no íleo quando as aves eram alimentadas com *Lactobacillus reuteri, Bacillus subtilis,* e *Saccharomyces cerevisiae* e virginiamicina.

Sabendo que o jejuno e íleo são os segmentos relacionados com maior absorção de nutrientes, o aumento da largura das vilosidades nos primeiros 14 dias pode ser atribuído pela compensação do menor comprimento de vilosidades na mesma fase, Isto está relacionado com a superfície de absorção do intestino que beneficia a absorção de nutrientes refletido em melhor desempenho.

Tabela 4. Largura da vilosidade do duodeno (LD), do jejuno (LJ) e do íleo (LI) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	14 dias (*µm*)			28 dias (*µm*)			42 dias (*µm*)		
	LD	LJ	LI	LD	LJ	LI	LD	LJ	LI
CP	37,84	28,11	30,67	99,41	87,76	82,69	101,45	93,37	92,46
CN	31,82[x]	29,31	31,89	104,44	84,63	84,59	105,17	90,91	93,22
30	40,37	37,22[x]	39,30[x]	82,11	83,82	85,50	88,11	90,37	95,74
Ácido cítrico	29,54[x]	31,76	39,13[x]	83,80	70,05[x]	83,05	101,13	78,13	90,50
GalliPro®	37,25	30,21	30,68	102,54	81,02	86,21	112,48	88,01	87,42
Teste F	13,59	6,12	8,27	4,96	3,68	0,06	3,18	2,00	0,22
Valor P	<0,0001	0,0040	0,0019	0,0095	0,0354	0,9937	0,0443	0,1465	0,9221
CV%	3,50	4,63	4,68	5,12	4,64	7,67	4,91	4,77	7,21

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Número das vilosidades do intestino delgado

Os efeitos dos tratamentos sobre o número de vilosidades no duodeno, jejuno e íleo nas fases de criação em frangos de corte se encontram na Tabela 5. Houve efeito significativo dos tratamentos para o número das vilosidades na fase final das aves.

Aves alimentadas com controle negativo e 30 ppm do *Paenibacillus* sp. apresentaram maior (P<0,05) número de vilosidades intestinais no duodeno e jejuno, respectivamente aos 42 dias de idade que o controle positivo (lincomicina). No entanto, não houve diferença (P>0,05) do número das vilosidades para as demais fases de criação.

Tabela 5. Número de vilosidades do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	14 dias			28 dias			42 dias		
	Duodeno	Jejuno	Ileo	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
CP	13,26	14,53	13,26	13,69	15,32	15,18	16,03	16,54	15,38
CN	13,07	12,90	13,13	13,20	15,53	15,43	19,79^{x}	16,46	16,46
30	15,32	16,14	13,50	16,38	17,48	16,65	16,41	18,79^{x}	16,70
Ácido cítrico	15,43	15,68	14,50	16,00	17,62	15,54	18,26	18,53	15,68
GalliPro®	14,24	16,05	14,24	14,98	17,79	15,01	18,82	17,62	15,31
Teste F	1,29	1,65	0,36	1,69	0,87	0,65	3,91	3,29	0,61
Valor P	0,3169	0,2141	0,8324	0,2043	0,5031	0,6360	0,0297	0,0400	0,6644
CV%	6,84	7,11	7,37	7,26	7,80	5,14	4,60	3,40	5,34

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Número de células caliciformes do intestino delgado

O número de células caliciformes do intestino dos frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias, submetidos aos tratamentos apresentam-se na Tabela 6.

Houve um incremento (P<0,01) das células caliciformes aos 14 e 28 dias nos diferentes segmentos do intestino delgado em frangos de corte tratados com ácido cítrico em comparação com o grupo controle positivo (lincomicina). Assim como o controle negativo e GalliPro® no duodeno e íleo, respectivamente, aos 14 dias de idade. No entanto, a dieta que contém 30 ppm do probióticos *Paenibacillus* sp. apresentou menor (P<0,01) número de células caliciformes no jejuno e íleo aos 14 dias e maior (P<0,01) no duodeno aos 28 dias que o controle positivo. Não houve diferenças (P>0,05) no número de células caliciformes entre os tratamentos sobre o controle positivo aos 42 dias de idade.

Baurhoo et al. (2007, 2009) encontraram diferenças no número das células caliciformes no intestino delgado em frangos de corte tratados com prebióticos (mananoligasacarídeos e lignina) em relação aos tratados com virginiamicina. Assim como, Rajput et al. (2013) que encontraram diferenças no jejuno mas não no íleo. Kum et al. (2010) observaram aumento de células caliciformes aos 21 e 42 dias de idade em aves quando tratadas com ácidos orgânicos (butirato de cálcio, propionato de cálcio, lactato de cálcio, formiato de cálcio e um óleo essencial puro).

O ácido cítrico atuou como estimulador na produção de células caliciformes talvez como resposta à mudança na microbiota intestinal, que pode ter produzido maior quantidade de mucina para facilitar a eliminação de patógenos.

Tabela 6. Número de células caliciformes do intestino delgado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade, sumetidos a melhoradores de desempenho.

Tratamentos	14 dias (*µm)*			28 dias (*µm)*			42 dias (*µm)*		
	Duodeno	**Jejuno**	**Ileo**	**Duodeno**	**Jejuno**	**Ileo**	**Duodeno**	**Jejuno**	**Ileo**
CP	144,38	301,62	303,69	44,06	79,63	80,13	39,94	72,13	73,42
CN	196,34^{x}	302,88	324,25	45,69	93,19	101,88	40,81	67,19	67,75
30	141,44	206,06^{x}	231,25^{x}	72,30^{x}	90,31	75,35	42,25	76,70	69,19
Ácido cítrico	317,19^{x}	373,80^{x}	256,56	63,88^{x}	102,94^{x}	109,12^{x}	47,56	92,03	91,31
GalliPro®	156,75	318,75	384,88^{x}	45,36	74,06	72,16	42,25	71,84	67,06
Teste F	52,30	19,86	16,47	16,90	3,98	6,42	0,66	2,46	3,66
Valor P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0057	0,0002	0,6219	0,0537	0,0094
CV%	6,43	6,63	5,68	5,70	8,79	9,67	8,61	8,95	9,21

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Número de células de Kupffer do fígado

O número de células de Kupffer do fígado dos frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, submetidos a dietas experimentais se encontram na Tabela 7. Aos 14 dias de idade o probiótico *Bacillus subtilis* e aos 28 dias de idade o probiótico 30 ppm do *Paenibacillus* sp. apresentaram maior *(P*<0,01) número de células de Kupffer no fígado. No entanto, o grupo controle negativo apresentou menor (*P*<0,01) número de células de Kupffer aos 28 e 42 dias de idade em relação ao controle positivo.

Tabela 7. Número de células de Kupffer do fígado de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	Células de Kupffer		
	14 dias	28 dias	42 dias
CP	29,25	38,70	44,34
CN	21,25	29,5^{x}	34,25^{x}
30	39,00	53,25^{x}	46,25
Ácido cítrico	33,50	43,00	46,75
GalliPro®	48,25^{x}	42,29	47,25
Teste F	19,34	39,53	6,40
Valor P	<0,0001	<0,0001	0,0061
CV%	7,65	3,98	5,14

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Área total, perímetro e diâmetro dos ácinos serosos do pâncreas

As medidas da área total, perímetro e diâmetro dos ácinos serosos do pâncreas de frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, submetidos a dietas com probiótico (*Paenibacillus* sp. e *Bacillus subtilis*) e ácido cítrico encontram-se na Tabela 8. Observamos efeito significativo dos tratamentos para todos os parâmetros nas fases de desenvolvimento das aves.

O perímetro dos ácinos serosos foi maior (P<0,01) nas três fases de criação de frangos de corte arraçoados com 30 ppm do probióticos *Paenibacillus* sp. No entanto, o perímetro e diâmetro aos 14 e 28 dias, assim como área total aos 28 dias de idade, foram menores (P<0,01) para as aves que receberam dietas com ácido cítrico e GalliPro®, respectivamente.

Tabela 8. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) dos ácinos serosos do pâncreas de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	14 dias (*µm*)			28 dias (*µm*)			42 dias (*µm*)		
	AT	PE	D	AT	PE	D	AT	PE	D
CP	167,85	52,19	19,10	258,42	66,43	25,29	326,55	73,62	28,25
CN	168,04	52,01	19,22	257,42	68,20	26,03	332,54	76,27	29,01
30	177,36	56,14^{x}	20,57	251,87	70,18^{x}	26,54	334,54	77,94^{x}	29,43
Ácido cítrico	161,90	47,63^{x}	17,08^{x}	238,84^{x}	59,66^{x}	22,38^{x}	335,09	72,04	26,81
GalliPro®	165,80	48,60^{x}	17,40	239,12^{x}	60,33^{x}	22,38^{x}	334,88	71,41	26,94
Teste F	3,57	18,16	10,00	7,71	40,54	20,86	0,74	10,68	5,57
Valor P	0,0306	<0,0001	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5653	<0,0001	0,0003
CV%	1,79	1,55	2,46	1,56	1,35	1,80	1,26	1,15	1,80

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Área total, perímetro e diâmetro das ilhotas pancreáticas (Langerhans)

As medidas da área total, perímetro e diâmetro das ilhotas pancreáticas (de Langerhans) dos frangos de corte machos nas idades de 14, 28 e 42 dias, tratados com o probiótico *Paenibacillus* sp. encontram-se na Tabela 9.

Frangos alimentados com dieta contendo ácido cítrico apresentaram maior (P<0,01) área total, perímetro e diâmetro de células pancreáticas aos 14 dias de idade. Porém, aos 42 dias de idade o probiótico à base de *Paenibacillus* sp. e ácido cítrico proporcionaram menor área total aos 42 dias de idade em relação ao controle positivo (lincomicina).

Tabela 9. Área total (AT), perímetro (PE) e diâmetro (D) das células pancreáticas (ilhotas de Langerhans) de frangos de corte machos aos 14, 28 e 42 dias de idade tratados com melhoradores de desempenho.

Tratamentos	14 dias (*µm*)			28 dias (*µm*)			42 dias (*µm*)		
	AT	PE	D	AT	PE	D	AT	PE	D
CP	354660	69941	25290	519003	82686	29264	500634	85330	30682
CN	355230	68878	25198	426782	77122	27700	442816	77185	28106
30	298182	71739	26223	472657	85137	29966	368499^{x}	76709	28032
Ácido cítrico	473572^{x}	86190^{x}	30837^{x}	477438	82124	29667	400156^{x}	73748	26828
GalliPro®	372893	75567	27481	401557	74674	27165	419092	77683	28367
Teste F	9,88	8,19	5,98	2,17	2,30	1,35	3,70	1,89	1,37
Valor P	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,1335	0,0598	0,3097	0,0348	0,178	0,3021
CV%	6,76	3,71	4,17	7,23	3,55	3,77	6,78	4,15	4,28

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Atividade enzimática do pâncreas

As atividades das enzimas pancreáticas em frangos de corte alimentados com probiótico *Paenibacillus* sp. e ácido cítrico aos 28 e 42 dias de idade são apresentadas na Tabela 10 (µmol/min/mg proteína) e Tabela 11 (unidades totais micromols) respectivamente.

Não houve efeito significativo (P>0,05) dos tratamentos, para a atividade da amilase, tripsina e quimotripsina do pâncreas aos 28 e 42 dias de idade em comparação ao tratamento com lincomicina (Tabela 10 e 11). A atividade especifica das enzimas pancreáticas não foi afetada pelos tratamentos.

Esses resultados coincidem com os de Traesel et al. (2010) que não encontraram diferenças na atividade da amilase em frangos de corte tratados com óleos à base de orégano (*Origanum vulgare L.*), sage (*Salvia officinalis L.*), rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), e chili pepper (*Capsicum frutescens L.*). Por outro lado, Jang et al. (2007, 2013) ao tratarem frangos com óleos essenciais e *Prunus mume,* respectivamente, encontraram diferenças com relação ao controle positivo (colistina e neomicina+oxitetraciclina).

Tabela 10. Atividade de enzimas pancreáticas (µmol/min/mg proteína) aos 28 e 42 dias de idade em frangos de corte submetidos a melhoradores de desempenho.

Tratamentos	Peso pâncreas (g)	28 dias			42 dias		
		Amilase	Tripsina	Quimotripsina	Amilase	Tripsina	Quimotripsina
CP	3,52	179,19	24,08	6,84	198,05	18,78	10,13
CN	3,23	144,47	26,23	8,33	252,10	16,44	7,36
30	3,61	161,48	22,13	7,55	187,55	15,88	8,32
Ácido cítrico	2,91	186,37	19,65	8,08	180,22	20,59	10,15
GalliPro®	3,47	160,84	27,17	4,65	161,31	17,85	8,12
Teste F		1,32	0,44	1,53	2,08	0,38	0,86
Valor P		0,32	0,77	0,26	0,14	0,82	0,51
CV%		9,20	18,71	17,65	12,38	16,47	15,16

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

[a-c]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

[x-z]Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

Tabela 11. Atividade de enzimas pancreáticas (unidades totais micromols) aos 28 e 42 dias em frangos de corte submetidos a melhoradores de desempenho.

Tratamentos	Peso pâncreas (g)	28 dias			42 dias		
		Amilase	Tripsina	Quimotripsina	Amilase	Tripsina	Quimotripsina
CP	3,52	6407,11	861,27	243,27	7812,02	758,36	402,07
CN	3,23	4687,26	868,15	271,77	11035,00	717,43	329,90
30	3,61	5822,54	795,28	274,96	8169,51	700,63	378,50
Ácido cítrico	2,91	5312,30	583,78	249,55	7178,97	879,17	433,42
GalliPro®	3,47	5630,56	927,37	161,75	7180,57	794,87	362,04
Teste F		1,04	0,56	0,93	2,61	0,20	0,25
Valor P		0,43	0,70	0,49	0,09	0,94	0,91
CV%		13,53	21,77	22,51	12,91	19,71	20,73

CP: Controle positivo (lincomicina); CN: Dieta controle (à base de milho + farelo de soja); 30: 30 ppm do probiótico gênero *Paenibacillus* sp.; Ácido cítrico: ácido orgânico à base de ácido cítrico; GalliPro®: probiótico à base *Bacillus subtilis*.

$^{a-c}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle negativo pelo Teste de Dunnett.

$^{x-z}$Medias seguidas de diferentes letras diferem significativamente (P≤0,05) do controle positivo pelo Teste de Dunnett.

4. CONCLUSÕES

Os aditivos não alteraram o desempenho de frangos de corte, no entanto, interferiram na morfometria intestinal. O ácido cítrico apresentou efeito significativo na proliferação das células caliciformes em comparação com a lincomicina.

As aves tratadas com os probióticos e ácido orgânico não apresentaram diferença significativa no desempenho. O ácido cítrico**,** aos 14 dias**,** apresentou menores e maiores medidas de comprimento e largura no duodeno e íleo, respectivamente, em comparação ao controle positivo. O tratamento com ácido cítrico apresentou um grande efeito no número de células caliciformes aos 14 dias**,** equilibrando-se gradativamente aos 28 e 42 dias de idade das aves. Isto pode ser justificado pelo fato do ácido cítrico diminuir o pH intestinal das aves e consequentemente irritar a mucosa intestinal aumentando o número de células caliciformes desencadeando**,** provavelmente**,** aumento na quantidade de mucina para maior proteção intestinal.

O tratamento com o probióticos GalliPro®**,** aos 14 dias**,** estimulou maior produção de células de Kupffer ou seja, células fagocíticas, no entanto, o tratamento com 30 ppm de *Paenibacilus* sp. teve similar resposta aos 28 dias de idade. Levando-se em conta que o *Bacillus subtilis* é parte da microbiota intestinal, este apresentou um poder de adaptação mais rápida (14 dias) em relação ao *Paenibacillus* sp. que se evidenciou mais tardio (28 dias), provavelmente por ser um micro-organismo alheio a este meio ambiente.

5. REFERÊNCIAS

AFSHARMANESH, M.; SHARIF PAGHALEH, A.; KHEIRANDISH, R. Effects of sprouted and nonsprouted wheat and barley with and without enzyme on intestinal morphometry of broiler chickens. **Comp. Clin. Pathol**., v. 22, p. 993–998, 2013.

BAURHOO, B.; PHILLIP, L.; RUIZ-FERIA, C.A. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. **Poult. Sci**., v. 86, p. 1070-1078, 2007.

BAURHOO, B.; FERKET, P. R. and ZHAO, X. Effects of diets con taining different concentrations of mannanoligosaccharide or an tibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. **Poult. Sci.,** v. 88, p. 2262–2272, 2009.

DUNNETT, C.W. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. **J. Am. Stat. Assoc**., v. 272, p. 1096-1121, 1955.

DUNNETT, C.W. New tables for multiple comparisons with a control. **Biometrics,** v. 20, p. 482-491, 1964.

GUNAL, M.; YAYLI, G.; KAYA, O.; KARAHAN, N.; SULAK, O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organism acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. **Int. J. Poult. Sci**., v. 5, n. 2, p. 149-155, 2006.

HERNÁNDEZ, F.; GARCÍA, V.; MADRID, J.; ORENGO, J.; CATALÁ, P.; MEGÍAS, M.D. Effect of formic acid on performance, digestibility, intestinal histomorphology and plasma metabolite levels of broiler chickens. **Brit. Poult. Sci**., v. 47, p. 50-56, 2006.

JANG, I.S.; KO, Y.H.; KANG, S.Y.; LEE, C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Anim. Feed Sci. Technol**., v. 134, p. 304–315, 2007.

JANG, I.; KANG, S.; KO, Y. Influence of Plum (*Prunus Mume Siebold* and *Zucc*.) products on growth performance, intestinal function and immunity in broiler chicks. **JPSA,** v. 50, p. 28-36, 2013.

KABIR, S.M.L.; RAHMAN, M.M.; RAHMAN, M.B.; RAHMAN, M.M. and AHMED, S.U. The Dynamics of Probiotics on Growth Performance and Immune Response in Broilers. **Int. J. Poult. Sci.,** v. 3, n. 5, p. 361-364, 2004.

KHAMBUALAI, O.; YAMAUCHI, KOH-EN; RUTTANAVUT, J.; INCHAROEN, T.; KASHIMURA, J. Effect of Sugar Cane Extract, Commercial Probiotic and their Mixture on Growth Performance and Intestinal Histology in Broiler Chickens. **American J. Animal & Vet. Sci.,** v. 5, n. 2, p. 132-138, 2010.

KUM, S.; EREN, U.; ONOL, A. G. and SANDIKCI, M. Effects of dietary organic acid supplementation on the intestinal mucosa in broilers**. Rev. Med. Vet.** (Toulouse), v. 10, p. 463–468, 2010.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUD, J.J. **SAS for linear models** 4. Ed, Cary, NC. SAS Institute, 2002.

MATHEW, A.G.; CISSELL, R. and LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: A United States perspective of livestock production, Foodborne **Pathog. Dis.,** v. 4, p. 115–133, 2007.

MONTAGNE, L.; PLUSKE, J.R. and HAMPSON, D.J. A review of interactions between dietary fiber and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in 66 young non-ruminant animals. **Anim. Feed Sci. Technol.,** v. 108, n. 95, p. 117, 2003.

MOUNTZOURIS, K.C.; TSITRSIKOS, P.; PALAMIDI, I.; ARVANITI, A.; MOHNL, M.; SCHATZMAYR, G.; FEREGOS, K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. **Poult. Sci**., v. 89, p. 58-67, 2007.

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

PAUL, S.K.; SAMANTA, G.; HALDER, G.; BISWAS, P. Effect of a combination of organic acid salts as antibiotic replacer on the performance and gut health of broiler chickens, **Livest. Res. Rural Dev.,** v. 19, n. 11, 2007.

PRIYANKARAGE, N.; SILVA, S.S.P.; GUNARATNE, S.P.; PALLIYAGURU, M.W.C.D.; WEERASINGHE, W.M.P.B.; FERNANDO, P.S. Comparison of the efficacies of different probiotics for broiler chickens. **Brit. Poult. Sci**., v. 44, p. 42-43, 2003.

RAJPUT, I.R.; LI, L.Y.; XIN, X.; WU, B.B.; JUAN, Z.L.; CUI, Z.W.; YU, D.Y.; LI, W.F. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure

modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. **Poult. Sci.,** v. 92, p. 956-965, 2013.

SALIM, H.M.; KANG, H.K.; AKTER, N.; KIM, D.W.; KIM, J.H.; KIM, M.J.; NA, J.C.; JONG, H.B.; CHOI, H.C.; SUH, O.S. and KIM, W.K. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens**. Poult. Sci.,** v. 92, p. 2084–2090, 2013.

SAKATA, T.; KOJIMA, T.; FUJIEDA, M.; MIYAKOZAWA, M.; TAKAHASHI, M. and USHIDA, K. Probiotic Preparations Dose-Dependently Increase Net Production Rates of Organic Acids and Decrease that of Ammonia by Pig Cecal Bacteria in Batch Culture **Dig. Dis. Sci.,** v. 44, n. 7, p. 1485-1493, 1999.

SAS INSTITUTE INC**. SAS System for Microsoft Windows.** SAS Institute Inc., Campus Drive, Cary, NC. USA, 2011.

SHARIFI, S.D.; DIBAMEHR, A.; LOTFOLLAHIAN , H. and BAURHOO, B. Effects of flavomycin and probiotic supplementation to diets containing different sources of fat on growth performance, intestinal morphology, apparent metabolizable energy, and fat digestibility in broiler chickens**. Poult. Sci.,** v. 91, p. 918–927, 2012.

SUN, X.; MCELROY, A.; WEBB, JR., K.E.; SEFTON, A.E.; NOVAK, C. Broiler Performance and Intestinal Alterations when Fed Drug-Free Diets**. Poult. Sci.,** v. 84, p. 1294-1302, 2005.

SWARTZ, M.N. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. **Clin. Infect. Dis.,** v. 34(3), p. 111-122, 2002.

TEO, A.Y.; TAN, H.M. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). **J. Appl. Poult. Res.,** v. 16, p. 296–303, 2007.

THRELFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS Microbiol. Rev.,** v. 26, p. 141-148, 2002.

TRAESEL, C.K.; WOLKMER, P.; SCHMIDT, C.; SILVA, C.B.; PAIM, F.C.; ROSA, A.P.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M.; LOPES, S.T.A. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. **Comp. Clin. Pathol.,** v. 20, p. 453–460, 2011.

TSIRTSIKOS, P.; FEGEROS, K.; BALASKAS, C.; KOMINAKIS, A.; MOUNTZOURIS, K.C. Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. **Poult. Sci.,** v. 91, p. 1860-1868, 2012.

VUKIĆ VRANJES M. & WENK C. Influence of dietary enzyme complex on the performance of broilers fed on diets with and without antibiotic supplementation. **Brit. Poult. Sci**., v. 36, p. 265-275, 1995.

WHO (World Health Organization), 2001, Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health, Report of a WHO consultation, Oslo, Norway, September 2001, **World Health Organization Department of Communicable Disease**, Sur veillance and Response, Accessed August 2013, http://whqlibdoc, who,int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_EPH_2002,11,pdf.

Anexo 1. Resumo de estudos que avaliaram aditivos na ração sobre o desempenho em frangos de corte.

Referência		Tratamentos	A	NA	Idade	Resultados[1]		
					Dias	GP	CR	CA
Jin et al. 1996	T1	Controle, dieta basal (DB)			1-28	≥	-	≤
	T2	DB+0,1% *Bacillus subtilis* (alimento)		X				
	T3	DB+0,2% *Lactobacillus sp*. (alimento)						
	T4	DB+5g *Lactobacillus* sp.(água)						
Cavazzoni et al. 1998	T1	Controle, (DB)	X		1-7/1-5	ns/ns	ns/ns	ns/ns
	T2	DB+virginamicina (10mg/kg)			7-21/5-10	>/ns	ns/ns	ns/ns
	T3	DB+*B. coagulans* (CNCM I-1061)			21-2510-19	>/ns	ns/ns	ns/ns
		1000/250mg/kg 1-7/8-49 dias			25-35/19-33	>/>	ns/ns	ns/ns
					35-49/33-49	>/>	ns/ns	ns/ns
Jin et al. 1998	T1	Controle, (DB)		X	1-21	≥	-	≤
	T2	DB+0,05% *Lactobacilus* sp.			22-42		-	≤
	T3	DB+0,10% *Lactobacilus* sp.			1-42	≥	-	≤
	T4	DB+0,15% *Lactobacilus* sp.						
		(2 stirpes *L. acidophilus,* 3 stirpes *L. fermentum*, 1 stirpe *L. crispatus* e 6 estirpes *L. brevis*)						
Jin et al. 2000	T1	Controle, (DB)		X	1-40	>	-	<
	T2	DB+0,1% *L. acidophilus*						
	T3	DB+0,1% *(*2 stirpes *L. acidophilus, 3 stirpes L. fermentum, 1 stirpe L. crispatus e 6 estirpes L. brevis*)						
Sun et al. 2005	T1	Controle, (DB)	X		0-14	ns	ns	ns
	T2	DB+lincomicina (2/4g/t início e crescimento)			15-28	ns	ns	ns
	T3	DB+Acid Pak 4-Way (0,5 g/L água), VegPro (0,91 kg/t), MTB-100 (0,45 kg/t), Bio-Mos e All-Lac XCL			29-35	ns	ns	ns
	T4	DB+Bio-Mos e All-Lac XCL			36-49	ns	ns	≤
		Bio-Mos (Manano-oliossacarídeo)						
		Acid Pak 4-Way (ácido cítrico e ascórbico)						

		MTB-100 (anti micotoxina) All-Lac XCL (*Lactobacilli, Enterococcus,* e *Pediococcus*)					
Mutus et al. 2006	T1 T2	Controle, (DB) DB+*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*		X	1-42	ns	ns	ns
Hernández et al. 2006	T1 T2 T3 T4	Controle, (DB) DB+avilamicina (10mg/kg) DB+ácido fórmico (5g/kg) DB+ácido fórmico (10g/kg)			1-21 22-42 1-42	ns ns ns	ns ns ns	ns ns ns
Gunal et al. 2006	T1 T2 T3 T4 T5	Controle, (DB) DB+0,1% Protexin DB+0,1% Flavomicina DB+0,2% Genex DB+0,1% Protexin+0,2%Genex	X		1-21 22-42 1-42	ns ns ns	ns ns ns	ns ns ns
		(Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Aspergillus orizea, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, Candida pintolepesii) Genex (ácido propiónico e fórmico, extracto de plantas, óleos essenciais e sais minerais)						
Liu et al. 2007	T1 T2	Controle, (DB) DB+*Lactobacillus reuteri* Pg4 (1mg/kg)		X	0-21 22-37 0-37	> ns ns	ns ns ns	ns ns ns
Mountzouris et al. 2007	T1 T2 T3 T4	Controle, (DB) DB+1g/kg Biomin Poultry5Star (alimento e água) DB+1g/kg Biomin Poultry5Star (alimento) DB+avilamicina (2,5mg/kg) (*Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium, Bifidobacterium animalis, Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus salivarius*)	X		7 14 21 28 35 42 1-42	ns ns ns ≥ ns ≥ ≥	≤ ≥ ns ns ns ns ns	- - - - - - ≤

Paul et al. 2007	T1	Controle, (DB) + virganimicina (0,5g/kg)			0-21	ns	<	<
	T2	DB+1,5g/kg formato de amónio e propionato de cálcio			0-42	ns	<	<
	T3	DB+1g/kg formato de amónio, propionato e lactato de cálcio						
Samli et al. 2007	T1	Controle, (DB)			0-21	≥	ns	≤
	T2	DB+3,5% soro em pó (80% lactose)		X				
	T3	DB+0,2% *E. faecium* (NCIMB 10415)						
	T4	DB+3,5% soro em pó + 0,2% *E. faecium*						
Teo e Tan, 2007	T1	Controle, (DB)			1-21	≥	≥	ns
	T2	Controle positivo (bacitracina de zinco, 100 mg/kg)	X		22-42	ns	≤	≤
	T3	BD+10^8 cfu/t *Bacillus subtilis*			1-42	≤	≤	≤
	T4	BD+10^9 cfu/t *Bacillus subtilis*						
Apata, 2008	T1	Controle, (DB)			35	>	>	≤
	T2	DB+20 mg/kg *Lactobacillus bulgaricus*						
	T3	DB+40 mg/kg *Lactobacillus bulgaricus*		X				
	T4	DB+60 mg/kg *Lactobacillus bulgaricus*						
	T5	DB+80 mg/kg *Lactobacillus bulgaricus*						
Khambualai et al. 2010	T1	Controle, (DB)			8-49	ns	ns	ns
	T2	DB+0,05% extracto de câna (*Saccharum officinarum L.*)		X				
	T3	DB+0,40% Super-BioLicks®						
	T4	DB+0,05% extracto de câna de açúcar *(Leuconostoc sp., Pichia sp.* e *Bacillus subtilis)*						
Mountzouris et al. 2010	T1	Controle, (DB)			1-14	ns	ns	ns
	T2	DB+10^8 cfu/kg PoultryStar ME			15-28	≥	ns	≤
	T3	DB+10^9 cfu/kg PoultryStar ME	X		29-42	≥	ns	≤
	T4	DB+10^{10} cfu/kg PoultryStar ME			1-42	≥	ns	≤
	T5	DB+avilamicina (2,5mg/kg) (*Lactobacillus reuteri* DSM 16350, *Enterococcus faecium* DSM 16211, *Bifidobacterium animalis* DSM 16284, *Pediococcus acidilactici* DSM 16210						

		e *Lactobacillus salivarius* DSM 16351)					
Priyankarage et al. 2010	T1	Controle, (DB)	X	7-21	≥	-	≤
	T2	Controle positivo (bacitracina de zinco, 0,25 g/kg)		22-42	ns	-	ns
	T3	BD+Protexin *(Lactobacillus, Streptococcus e Bifidobacteria)*		7-42	ns	-	ns
	T4	BD+G-Probiotic (*Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus acidophilus e Streptococcus faecium)*					
	T5	DB+Hi-yield (*Saccharomyces cerevisiae*)					
Taheri et al. 2010	T1	Controle, (DB)	X	1-42	>	ns	<
	T2	DB+10^6 cfu/g *Pediococcus acido láctico*					
Torshizi et al. 2010	T1	Controle, (DB)	X	1-21	>	≥	ns
	T2	Água+0,5g/l Protexin		22-42	≥	>	<
	T3	DB+1g/kg Protexin *(Aspergillus oryzae, Lactobacillus acidophilus, L. rhamnosus, L. plantarum, L. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, Streptococcus thermophilus* e *Candida pintolopesii)*		1-42	>	<	ns
Lutfullah et al. 2011	T1	Controle, (DB)	X	7	ns	ns	ns
	T2	DB+0,5g/10kg Protexin		14	ns	ns	-
	T3	DB+1,0g/10kg Protexin		21	ns	ns	-
	T4	DB+1,5g/10kg Protexin (*Lactobacillus plantarum, L. bulgaricus L. acidophilus, L. rhamnosus, Bifidobacterium bifidum, Streptococcus thermophilus, Enterococcus faecium, Aspergillus oryzae* e *Candida pintolopesii)*		28	≥	≤	-
				35	≥	>,<,=	≤
Aliakbarpour et al. 2012	T1	Controle, (DB)	X	42	>	ns	≤
	T2	DB+*Bacillus subtilis* (50mg/kg)					
	T3	DB+Primalac (1000mg/kg) Primalac *(Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium thermophilum, e Enterococcus faecium)*					

Sinol et al. 2012	T1	Controle, (DB)			1-21	>	≥	<
	T2	DB+0,15% *B. subtillis* LS 1-2			21-35	≥	≥	≥
	T3	DB+0,30% *B. subtillis* LS 1-2			1-35	>	≥	<
	T4	DB+0,45% *B. subtillis* LS 1-2						
Bai et al. 2013	T1	Controle, (DB)			1-21	ns	>	<
	T2	DB+cloridrato de tetraciclina (100mg/kg)	X		22-42	≥	ns	ns
	T3	DB+1x10^7 cfu/g *Lactobacillus fermentum*			1-42	ns	ns	ns
	T4	DB+2x10^6 cfu/g *Saccharomices cerevisiae*						
Chen et al. 2013	T1	Baixa densidade e baixa energia			1-7	≥	ns	ns
	T2	Baixa densidade e baixa energia + probiótico		X	8-28	ns	ns	ns
	T3	Alta densidade e alta energia			1-28	ns	ns	ns
	T4	Alta densidade e alta energia + probiótico *(Bacillus subtilis e Clostridium butyricum)*						
Hassanpour et al. 2013	T1	Controle, (DB)			22	ns	ns	ns
	T2	DB+0,1% Simbiótico (Biomin IMBO)		X	32	ns	>	ns
	T3	DB+0,2% Simbiótico (Biomin IMBO)			42	>	ns	ns
		Probiótico (*Enterococcus faecium*)						
		Prebiótico (fructo-oligossacarídeo)						
		Fragmentos de parede celular e						
		Substâncias derivada das algas (ficofítico)						

[1] Diferenças entre aditivos (probióticos, prebióticos, etc.) sobre o controle negativo. GP=ganho de peso; CR=consumo de ração; CA=conversão alimentar; A=antibiótico; NA= não antibiótico.

Anexo 2. Resumo de estudos que avaliaram aditivos na ração sobre o comprimento intestinal em frangos de corte.

Referência		Tratamentos	A	NA	Idade	Resultados[1]		
					Dias	Comprimento		
						D	J	I
Santin et al. 2001	T1	Controle, (DB)			7	≥	>	>
	T2	DB+0,1% *S. cerevisiae*		X	28	ns	ns	ns
	T3	DB+0,2% *S. cerevisiae*			42	ns	ns	ns
Samanya e Yamauchi, 2002	T1	Controle, (DB)			28	≥	ns	≥
	T2	DB+0,05% *Bacillus subtilis Natto Powder-710*		X				
	T3	DB+1% *Bacillus subtilis Natto Powder-710*						
	T4	DB+3% *Bacillus subtilis Natto Powder-710*						
Sun et al. 2005	T1	Controle, (DB)			14	ns	-	ns
	T2	DB+lincomicina (2/4g/t início e crescimento)			28	ns	-	ns
	T3	DB+Acid Pak 4-Way (0,5 g/L água), VegPro (0,91 kg/t), MTB-100 (0,45 kg/t), Bio-Mos e All-Lac XCL	X		5	ns	-	ns
	T4	DB+Bio-Mos e All-Lac XCL			49	ns	-	ns
		Bio-Mos(Manano-oligossacarídeo)						
		Acid Pak 4-Way (ácido cítrico e ascórbico)						
		MTB-100 (anti micotoxina)						
		All-Lac XCL (*Lactobacilli, Enterococcus,* e *Pediococcus*)						
Pelicano et al. 2005	T1	Controle, (DB)			21	ns	≥	≥
	T2	DB+*Bacillus subtilis*						
	T3	DB+Pool probióticos						
	T4	DB+Prebiótico (MOS)+ácido orgânico (AO)						
	T5	DB+MOS		X				
	T6	DB+*Bacillus subtilis*+MOS+AO						
	T7	DB+*Bacillus subtilis*+MOS						
	T8	DB+Pool probióticos+MOS+AO						
	T9	DB+Pool probióticos+MOS						

Sieo et al. 2005		Pool *(Lactobacillus acidophilus* e *casei*, *Streptococcus lactis* e *faecium, Bifidobacterium bifidum* e *Aspergillus oryzae*) MOS (mananoligossacarídeos fosforilados)						
	T1	Controle, (DB)			21	ns	≥	ns
	T2	DB+stirpe parenteral *Lactobacillus* sp.		X				
	T3	DB+stirpe transformada de *Lactobacillus* sp.						
Gunal et al. 2006	T1	Controle, (DB)			21	-	≥	≥
	T2	DB+0,1% Protexin			42	-	≥	≥
	T3	DB+0,1 Flavomicina	X					
	T4	DB+0,2% Genex						
	T5	DB+0,1% Protexin+0,2%Genex						
Hernández et al. 2006		*(Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Aspergillus orizea, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, Candida pintolepesii)* Genex (ácido propiónico e fórmico, extracto de plantas, óleos essenciais e sais minerais)						
	T1	Controle, (DB)			21	-	≤	-
	T2	DB+avilamicina (10mg/kg)	X		42	-	≥	-
	T3	DB+ácido fórmico (5g/kg)						
	T4	DB+ácido fórmico (10g/kg)						
Liu et al. 2007	T1	Controle, (DB)			21	-	-	>
	T2	DB+*Lactobacillus reuteri* Pg4 (1mg/kg)		X				
Samli et al. 2007	T1	Controle, (DB)			21	-	-	≥
	T2	DB+3,5% soro em pó (80% lactose)						
	T3	DB+0,2% *E. faecium (NCIMB 10415)*		X				
	T4	DB+3,5% soro em pó + 0,2% *E. faecium*						
Khambualai et al. 2010	T1	Controle, (DB)			49	≥	ns	ns
	T2	DB+0,05% extracto de câna (*Saccharum officinarum l.*)		X				

	T3	DB+0,40% Super-BioLicks®					
	T4	DB+0,05% extracto de câna *(Leuconostoc sp., Pichia sp.,* e *Bacillus subtilis)*					
Taheri et al. 2010	T1	Controle, (DB)		42	>	ns	>
	T2	DB+10^6 cfu/g *Pediococcus* ácido láctico	X				
Aliskbarpour et al. 2012	T1	Controle, (DB)		42	ns	≥	ns
	T2	DB+*Bacillus subtilis* (50mg/kg)	X				
	T3	DB+Primalac (1000mg/kg) Primalac *(Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium thermophilum,* e *Enterococcus faecium)*					
Sinol et al. 2012	T1	Controle, (DB)		35	≥	-	≥
	T2	DB+0,15% *B. subtillis* LS 1-2	X				
	T3	DB+0,30% *B. subtillis* LS 1-2					
	T4	DB+0,45% *B. subtillis* LS 1-2					
Tsirtsikos et al. 2012	T1	Controle, (DB)		14	ns	-	ns
	T2	BD+10^8 cfu/kg PoultryStar ME		42	ns	-	ns
	T3	BD+10^9 cfu/kg PoultryStar ME	X				
	T4	BD+10^{10} cfu/kg PoultryStar ME					
	T5	Controle positivo (avilamicina, 2,5mg/kg) (*Lactobacillus reuteri, Enterococcus faecium, Bifidobacterium animalis, Pediococcus acidilactici,* e *Lactobacillus salivarius*)					
Afsharmanesh et al. 2013	T1	Controle, dieta à base de milho (DB)		42	-	-	≥
	T2	Trigo-DB+0,1 % Safizyme® GP800					
	T3	Trigo germinado-DB+0,1 % Safizyme® GP800	X				
	T4	Trigo germinado-DB sem enzima					
	T5	Trigo-DB+0,1 % Safizyme® GP800					

	T6	Trigo germinado-DB +0,1 % Safizyme® GP800					
	T7	Trigo germinado-DB sem enzima					
Ashraf et al. 2013	T1	Controle, (DB)	X	42	>,<,=	≥	>,<,=
	T2	DB+0,5% Manano-oligassacarídeos (MOS)					
	T3	DB+0,1% *Lactobacillus* sp*.,* (LBP)					
	T4	DB+MOS+LBP					
Hassanpour et al. 2013	T1	Controle, (DB)	X	22	≥	<	≥
	T2	DB+0,1% Simbiótico (Biomin IMBO)		32	ns	ns	ns
	T3	DB+0,2% Simbiótico (Biomin IMBO)		42	>	ns	≤
		Probiótico (*Enterococcus faecium*)					
		Prebiótico (fructo-oligossacarídeo)					
		Fragmentos de parede celular e substâncias derivada das algas (ficofítico)					
Rajput et al. 2013a	T1	Controle, (DB)	X	21	>	≥	≥
	T2	DB+100mg/kg curcumina		42	≥	≤	≥
	T3	DB+150mg/kg curcumina					
	T4	DB+200mg/kg curcumina					
Yazdani et al. 2013	T1	Controle, (DB)	X	45	≥	>	ns
	T2	DB+2% extracto *Berberis vulgaris*					
	T3	DB+4% extracto *Berberis vulgaris*					

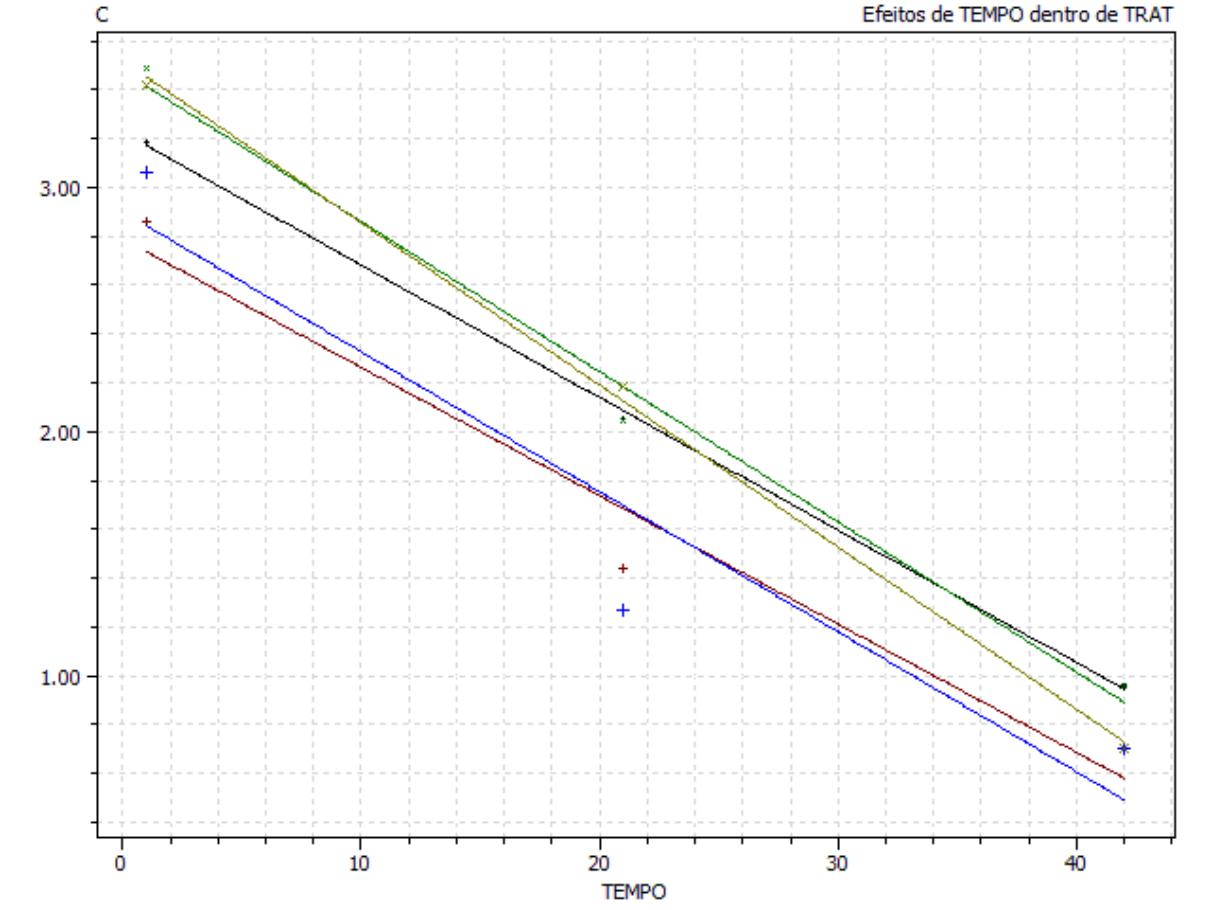
[1] Diferenças entre aditivos (probióticos, prebióticos, etc.) sobre o controle negativo; D=duodeno; J=jejuno; I=íleo; A=antibiótico; NA= não antibiótico.

Anexo 3. Contagem de unidades formadoras de colônias de clostridium no dia 0, 21 e 42 dias de criação de frangos de corte machos do CAPITULO II.

Dias	Tratamentos									
	30		45		60		CN		CP	
0	1922,5	a	861,25	a	2442,5	a	3647,5	a	4557,5	a
21	178,75	b	52,5	b	32,5	b	270	b	252,5	b
42	12,5	c	0	b	0	b	12,5	c	0	c
Teste F	110,93									
Valor P	<0,0001									

*Medias seguidas de diferentes letras na coluna diferem significativamente (P≤0,05) pelo Teste de Tukey.

Gráfico e regressão dos tratamentos e tempos (dados transformados log (x+5))



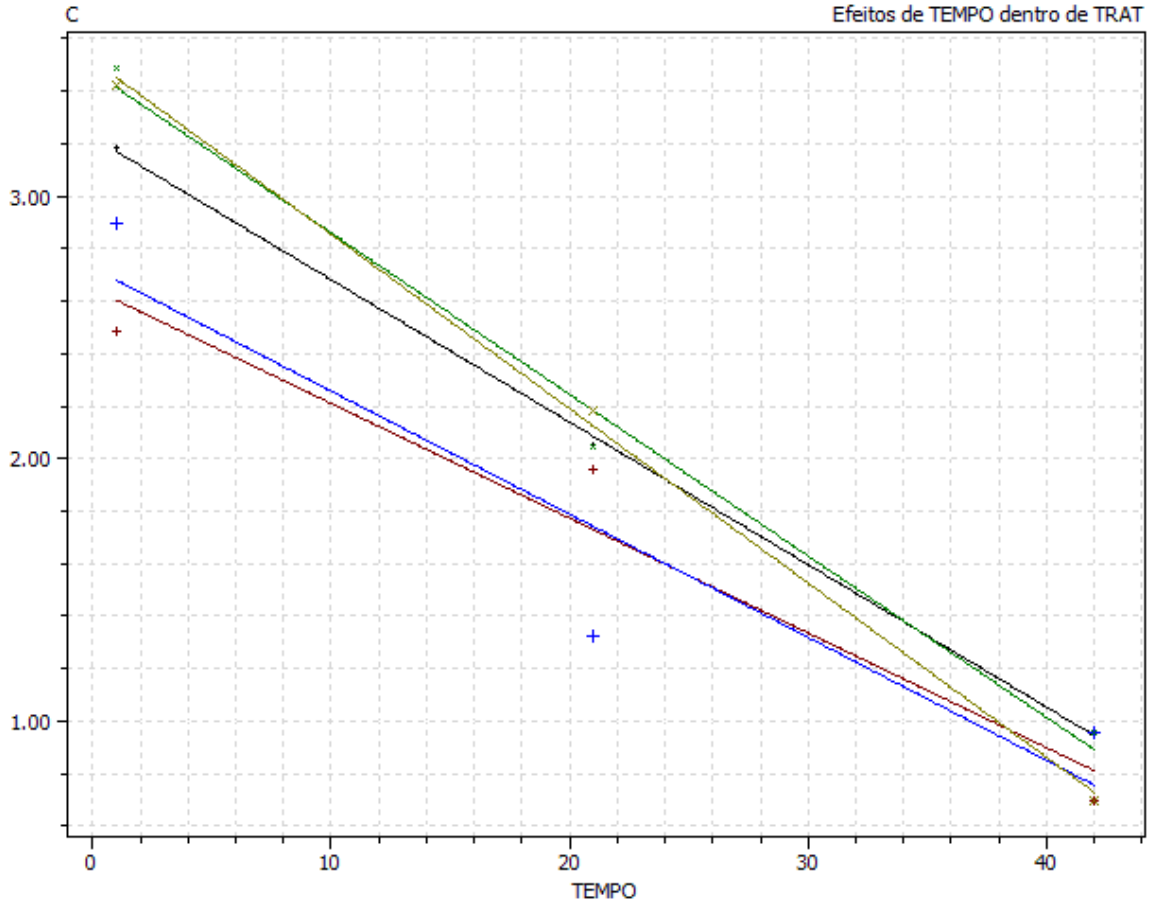
LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. TRA 30	37,81**	0,9995	y = 3,22479653 - 0,05428754x
TEMPO d. TRA 45	35,48**	0,9630	y = 2,78868167 - 0,05258826x
TEMPO d. TRA 60	42,23**	0,9104	y = 2,90069614 - 0,05737105x
TEMPO d. TRA C/A	48,59**	0,9908	y = 3,47557154 - 0,06154024x
TEMPO d. TRA ANT	56,61**	0,9985	y = 3,51887974 - 0,06642901x

Anexo 4. Contagem de unidades formadoras de colônias de clostridium no dia 0, 21 e 42 dias de criação de frangos de corte machos do CAPITULO III.

Dias	Tratamentos									
	30		Ácido cítrico		GalliPro		CN		CP	
0	1922,5	a	1938,75	a	816,25	a	3647,5	a	4557,5	a
21	178,75	b	87,5	a	71,25	b	270	b	252,5	b
42	12,5	c	0	b	12,5	b	12,5	c	0	c
Teste F	78,86									
Valor P	0,0001									

*Medias seguidas de diferentes letras na coluna diferem significativamente (P≤0,05) pelo Teste de Tukey.

Gráfico e regressão dos tratamentos e tempos (dados transfomados log (x+5))



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. TRA 30	31,14**	0,9995	y = 3,22479653 - 0,05428754x
TEMPO d. TRA AC	20,20**	0,9531	y = 2,64735979 - 0,04372320x
TEMPO d. TRA GP	23,27**	0,8766	y = 2,72678821 - 0,04692367x
TEMPO d. TRA C/A	40,02**	0,9908	y = 3,47557154 - 0,06154024x
TEMPO d. TRA ANT	46,63**	0,9985	y = 3,51887974 - 0,06642901x

Anexo 5. Área superficial das vilosidades do intestino do CAPITULO II

Tratamentos	14 dias						28 dias			42 dias		
	Duodeno		Jejuno		Ileo		Duodeno	Jejuno	Ileo	Duodeno	Jejuno	Ileo
30	58680,8	ab	50013,8	a	36654,5	a	323457,4	270410,9	237811,9	426169,4	332924,4	311972,9
45	72550,4	a	35056,4	ab	32113,3	ab	310199,8	278818,6	222275,0	477634,2	344819,7	352563
60	66253,9	ab	37720,5	ab	32496,7	ab	337547,9	246690,8	159220,7	467449,6	423916,7	332405,7
CN	51837,9	b	34548,9	ab	28058,3	ab	480158,3	295751,8	252392,9	486961,9	332898,5	280027,0
CP	63268,9	ab	30606,5	b	26306,3	b	395713,6	314685,2	204999,3	439838,1	377351,2	336818,3
Test F	3,07		2,87		3,75		2,42	0,81	1,70	0,29	1,43	0,58
Valor P	0,0494		0,0596		0,0263		0,0944	0,5404	0,2018	0,8805	0,2729	0,6806

*Medias seguidas de diferentes letras na coluna diferem significativamente (P≤0,05) pelo Teste de Tukey.

Anexo 6. Área superficial das vilosidades do intestino do CAPITULO III

Tratamentos	14 dias						28 dias			42 dias		
	Duodeno		Jejuno		Ileo		Duodeno	Jejuno	Ileo	Duodeno	Jejuno	Ileo
30	58680,8	a	500013,8	a	36654,5	a	323457,4	270410,9	237811,9	426169,4	332924,4	311972,9
Ácido cítrico	41225,8	b	34156,2	ab	43089,9	a	372429,7	204725,1	179254,5	506747,3	306416,2	245944,7
GalliPro	65147,8	a	34669,8	ab	26036,2	b	430146,5	247343,9	198990,1	574675,8	392676,2	283956,1
CN	51837,9	ab	34548,9	ab	28058,3	b	480158,3	295751,9	252392,8	486961,9	332898,5	280027,0
CP	63268,9	a	30606,5	b	26306,3	b	395713,6	314685,2	204999,3	439838,1	377351,2	336818,3
Test F	9,69		3,49		14,78		1,71	1,76	1,36	1,65	1,43	0,96
Valor P	0,0004		0,0331		<0,0001		0,200	0,1888	0,2934	0,2126	0,2731	0,4574

*Medias seguidas de diferentes letras na coluna diferem significativamente (P≤0,05) pelo Teste de Tukey.