

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

**USO DE *Bacillus subtilis* E BUTIRATO DE SÓDIO PARA  
PINTOS DE CORTE VACINADOS COM DIFERENTES  
CEPAS VACINAIS CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE**

**Haiala Cajazeira Coelho**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO/2015**

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

**USO DE *Bacillus subtilis* E BUTIRATO DE SÓDIO PARA  
PINTOS DE CORTE VACINADOS COM DIFERENTES  
CEPAS VACINAIS CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE**

**Haiala Cajazeira Coelho**

**Orientador:** Prof. Dr. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito

**Coorientador:** Msc. Priscilla Maria Cavalcante Rocha

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Nutrição e Alimentação Animal).

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C672u	<p>Coelho, Haiala Cajazeira.</p> <p>Uso de <i>Bacillus subtilis</i> e butirato de sódio para pintos de corte vacinados com diferentes cepas vacinais contra a Doença de Newcastle / Haiala Cajazeira Coelho. _ Cruz das Almas, BA, 2015.</p> <p>57f.; il.</p> <p>Orientador: Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Avicultura – Vacinação. 2.Ave – Doença de Newcastle. 3.Pinto – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.59</p>
-------	--

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

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**USO DE *Bacillus subtilis* E BUTIRATO DE SÓDIO PARA  
PINTOS DE CORTE VACINADOS COM DIFERENTES  
CEPAS VACINAIS CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE**

**Haiala Cajazeira Coelho**

**Orientador:** Prof. Dr. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito

**Coorientador:** Msc. Priscilla Maria Cavalcante Rocha

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL (Nutrição e Alimentação Animal), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Profa Dra Lia Muniz Barretto Fernandes  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dr. Eric Marcio Balbino  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Data da Realização: 21 de agosto de 2015

## **DEDICATÓRIA**

A Deus primeiramente, a minha família, aos meus professores, meus amigos, colegas e clientes que de uma forma ou de outra contribuíram com a minha formação profissional até aqui, com todo o experimento e que desta forma me senti apto e maduro para junto com meu orientador, co-orientadora, amigos e colegas do NEAR (Núcleo de Estudos em Avicultura do Recôncavo) construir este trabalho científico e que este possa contribuir com o conhecimento acadêmico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade concedida.

Aos meus amigos José Montini e Caroline Mendes pelo incentivo inicial do Mestrado como oportunidade de alcançar novas oportunidades.

Ao Professor e amigo Jerônimo Ávito por aceitar a Orientação desta Dissertação, mesmo sabendo que tenho trabalho e família para dividir a minha dedicação a esta Dissertação, pela compreensão às vezes por não atendimento dos prazos, pelos conselhos e todo o conhecimento que foi aprendido com esta parceria.

À minha Coorientadora Dra. Priscilla Rocha por todo apoio e dedicação prestado durante o experimento, trazendo toda sua experiência de outras pesquisas e tantos anos de experiência prática de campo, por ter dedicado tempo no suporte da correção da Dissertação parte escrita e nos diapositivos.

Ao Laboratório Ceva Saúde Animal, empresa que estou como colaborador e que me permitiu dispensa por 30 dias para realização do experimento.

À minha esposa Isadora pelo apoio e compreensão dos tempos dedicados à dissertação e pela mão de obra no auxílio do preparo e identificação de todo o material formolizado.

Aos meus amigos e colegas do grupo de pesquisa NEAR – Núcleo de Estudos em Avicultura do Recôncavo e amigos/irmãos Júnior Braga e Luiz Penna por todo apoio em todas as fases do experimento, desde ao carregamento da maravalha até o aviário experimental, fabricação de ração, idas a noite para manejo, até o abate no final do lote.

Agradeço também à equipe do Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. Agradeço também aos Professores Dr. Ricardo Abreu e Dr. Jerônimo Brito por permitir assistir às aulas como aluno ouvinte.

Agradeço também aos vigilantes; Bartolomeu e Samuel do aviário experimental pelo cuidado com o bem estar das aves em teste nos momentos da nossa ausência.

Um muito obrigado a todos do fundo do coração e que sejamos todos abençoados pelo nosso PAI, desejo muita saúde física e espiritual para vocês.

## EPÍGRAFE

“Precisamos ser a mudança que queremos ver no mundo”

Mahatma Gandhi

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Desenvolvimento do trato gastrointestinal</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Aditivos controladores de microbiota: antibióticos, probióticos e ácidos orgânicos</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 Doença de Newcastle</b> .....	<b>13</b>
2.3.1 Características do vírus e a Doença de Newcastle .....	13
2.3.2 Medidas de controle da Doença de Newcastle.....	15
2.3.3 Tipos de vacinas contra a Doença de Newcastle .....	16
2.3.4 Os programas vacinais e os níveis de proteção .....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Localização, registro de experimentação e época de realização</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 Aves e instalações</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 Delineamento e tratamentos experimentais</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4 Vacinas e Vacinação</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5 Manejo experimental e variáveis analisadas</b> .....	<b>27</b>
3.5.1 Manejo experimental .....	27
3.5.2 Variáveis analisadas.....	28
3.5.2.1 <i>Desempenho</i> .....	28
3.5.2.2 <i>Biometria</i> .....	28
3.5.2.3 <i>Morfometria</i> .....	29
3.5.2.4 <i>Sorologia</i> .....	30
<b>3.6 Análise estatística</b> .....	<b>31</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 Desempenho e características intestinais da fase pré-inicial</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2 Desempenho e características intestinais da fase inicial</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3 Sorologia</b> .....	<b>51</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das cepas Vacinais contra Doença de Newcastle .....	17
<b>Tabela 2.</b> Tratamentos utilizados de acordo com o tipo de vacina e nutrição..	24
<b>Tabela 3.</b> Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais da fase pré-inicial .....	25
<b>Tabela 4.</b> Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais da fase inicial .....	26
<b>Tabela 5.</b> Comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado de frangos de corte, aos sete (7) dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados.....	34
<b>Tabela 6.</b> Morfometria intestinal aos sete (7) dias de idade e desempenho dos frangos de corte aos 10 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados .....	36
<b>Tabela 7.</b> Comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado de frangos de corte, aos 14 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados.....	41
<b>Tabela 8.</b> Morfometria intestinal de frangos de corte aos 14 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados...	42
<b>Tabela 9.</b> Comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado de frangos de corte, aos 21 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados.....	44
<b>Tabela 10.</b> Morfometria intestinal e desempenho dos frangos de corte aos 21 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados.....	46
<b>Tabela 11.</b> Títulos de GMT em HI para Newcastle em função da dieta e tipo de vacina dos frangos de corte aos 7, 14 e 21 dias de idade .....	52

## USO DE *Bacillus subtilis* E BUTIRATO DE SÓDIO PARA PINTOS DE CORTE VACINADOS COM DIFERENTES CEPAS VACINAIS CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE

**RESUMO:** Este trabalho foi realizado para avaliar o efeito do uso de *Bacillus subtilis* e butirato de sódio, associados ao uso de aditivo melhorador de desempenho convencional (enramicina em nível subterapêutico) em rações de pintos de corte vacinados com diferentes cepas enterotrópicas contra a doença de Newcastle sobre o desenvolvimento intestinal e o desempenho de frangos de corte na fase inicial de criação. O experimento foi conduzido no setor de avicultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Utilizou-se 864 pintos de corte, fêmeas da linhagem Cobb, com um dia de idade e criados até 21 dias. Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, sendo duas dietas (aditivo melhorador de desempenho convencional - AMD e outra com adição de *Bacillus subtilis* e butirato de sódio como aditivos alternativos equilibradores de microbiota intestinal em associação ao AMD convencional – AAEMI e AMD) e duas cepas vacinais vivas enterotrópicas apatogênicas contra a Doença de Newcastle (PHY.LMV.42 e Ulster), totalizando quatro tratamentos, seis repetições e 36 aves por repetição. Não houve interação ( $P>0,05$ ) entre as diferentes cepas vacinais e o uso dos aditivos melhoradores de desempenho sobre a biometria intestinal aos 7, 14 e 21 dias. O grupo de aves vacinados com cepa Ulster obteve ( $P<0,05$ ) maior comprimento relativo do jejuno aos 7 dias de criação. Aos 21 dias de idade, o comprimento do duodeno foi maior ( $P<0,05$ ) nas aves alimentadas com rações contendo aditivos conjuntamente na ração (AMD e AAEMI). Foi observado maior altura das vilosidades e superfície de absorção no jejuno ( $P<0,05$ ) de aves aos 7 e 21 dias de idade que receberam dieta com aditivos alternativos (AMD e AAEMI) e que também refletiram nos melhores resultados encontrados para o desempenho nas respectivas idades. Houve interação ( $P<0,05$ ) entre os fatores estudados para altura de vilosidades do jejuno aos 14 dias, indicando que apenas no grupo de aves submetidas à cepa PHY.LMV.42, quando alimentadas com dietas contendo aditivos alternativos, houve aumento para esta variável. Os resultados demonstraram efeitos positivos do uso de aditivos equilibradores de microbiota intestinal usados como uma importante ferramenta para que se obtenha o desenvolvimento intestinal adequado e por consequência melhor desempenho produtivo das aves. As cepas vacinais avaliadas apresentam em algum grau, diferentes efeitos sobre o desenvolvimento intestinal e este fato pode implicar respostas diferenciadas sobre o desempenho nas fases iniciais de criação e que, por conseguinte, demanda novos estudos, específicos para avaliar tal questão.

**Palavras chave:** ácidos orgânicos, avicultura de corte, cepas apatogênicas, morfometria intestinal, probióticos

## USO DE *Bacillus subtilis* E BUTIRATO DE SÓDIO PARA PINTOS DE CORTE VACINADOS COM DIFERENTES CEPAS VACINAIS CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE

**ABSTRACT:** This study was conducted to evaluate the effect of the use of *Bacillus subtilis* and sodium butyrate associated with the use antibiotic growth promoting (AGP) conventionally (enramycin in subtherapeutic level) in broiler chicks, feed vaccinated with different strains (with tropism by intestine) of Newcastle disease on intestinal development and performance of broilers in the initial phase of rearing. The experiment was conducted in the poultry sector of the Federal University of Bahia Recôncavo (UFRB), used 864 broiler chicks, Cobb females with a day old and reared up to 21 days. It was adopted a completely randomized design in a 2x2 factorial design, with two diets (AGP conventional and one with addition of *Bacillus subtilis* and sodium butyrate as alternative additives balancers intestinal microbiota (AABIM) in association with Conventional AGP) and two live vaccine strains apathogenic against Newcastle disease (PHY.LMV.42 and Ulster), totaling four treatments, six replicates and 36 birds per repetition. There was no interaction ( $P > 0.05$ ) between the different vaccine strains and the use of performance enhancing additives on the intestinal biometrics at 7, 14 and 21 days. The vaccinated group of birds with Ulster strain obtained length greater ( $P < 0.05$ ) on the jejunum after 7 days of rearing. At 21 days of creation, the length of the duodenum was higher ( $P < 0.05$ ) in birds fed diets containing jointly in feed additives (AGP and AABIM). It was observed greater villus height and absorption surface in the jejunum ( $P < 0.05$ ) from birds at 7 and 21 days of age were fed a diet with alternative additives (AABIM and AGP) and also reflected in the performance results found for the their ages. There was interaction ( $P < 0.05$ ) among the factors studied for villi height of jejunum to 14 days and the results indicated that only the group of birds submitted to PHY.LMV.42 strain when fed diets containing alternative additives was increased to this variable. The results showed positive effect of using additives balancers intestinal microbiota used as an important tool in order to obtain the proper intestinal development and therefore better performance. The evaluated vaccine strains present in some degree different effects on intestinal development and this fact may imply different responses on performance in the early stages of creation and therefore demand further studies to evaluate this specific issue.

**Keywords:** apathogenic strain, intestinal morphometry, organic acids, poultry production, probiotics

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de aditivos promotores de crescimento em rações para animais de produção visa proteção da integridade intestinal e de qualquer perturbação digestiva devido ao crescimento bacteriano e fúngico, comum em produção confinada e com alojamento sequencial ao longo do tempo. A maioria dos promotores são antibacterianos utilizados em doses subterapêuticas nas rações.

Atualmente o uso de promotores de crescimento alternativos como prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos, entre outros, têm sido bem difundida. A utilização de probióticos constitui uma alternativa para minimizar os efeitos nocivos no epitélio intestinal que possam ser causados por qualquer agente patogênico. Os aditivos alternativos aos promotores convencionais tais como ácidos orgânicos e probióticos induzem principalmente uma manutenção da microbiota intestinal equilibrada. O principal benefício do ácido orgânico é a diminuição das enterobactérias como *Salmonella* e *Escherichia coli*, enquanto a exclusão competitiva promovida pelos probióticos tem efeito benéfico na produtividade, viabilidade, equilíbrio na microbiota intestinal e modulação do sistema imune.

Ainda com o objetivo de minimizar perdas nos processos de produção das aves estão sendo usadas vacinas contra a doença de Newcastle com cepas enterotrópicas apatogênicas. Comparativamente este vírus vacinal tem maior replicação na mucosa do trato gastro entérico e, portanto apresentam menor intensidade da reação vacinal respiratória considerada indesejável. Estas reações pós vacinais poderão ser mais intensas e possibilitarem surgimento de infecções bacterianas secundárias como o aumento de condenações no abatedouro, redução da viabilidade e do ganho de peso, pior conversão alimentar de lotes, sendo necessário o tratamento e conseqüentemente levando a aumento no custo de produção. Além deste benefício do uso de cepa apatogênica, contra a doença de Newcastle, outro fator importante é que algumas cepas vacinais para proteção contra doenças como bronquite infecciosa e pneumovirose replicam mais adequadamente no

trato respiratório gerando melhores respostas imunológicas, já que não haveria ocupação ou competição com vírus vacinal para Newcastle.

As cepas vacinais vivas enterotrópicas apatogênicas contra a doença de Newcastle são capazes de induzir proteção local com produção de imunoglobulinas específicas em mucosas mesmo ainda não tendo promovido a soroconversão.

É sabido que estas cepas enterotrópicas promovem proteção contra a doença de Newcastle (DN) assim como as cepas respiratórias. Contudo, são necessários maiores estudos sobre o mecanismo de ação das cepas apatogênicas enterotrópicas na mucosa intestinal e sobre possíveis danos no trato digestório que venha a comprometer a morfometria intestinal e absorção de nutrientes da dieta.

Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes dietas com aditivos melhoradores de desempenho (convencionais e alternativos) e sua relação com o uso de diferentes cepas apatogênicas enterotrópicas contra a doença de Newcastle estudando os efeitos sobre o desenvolvimento intestinal e o desempenho de frangos de corte na fase inicial de criação de aves.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Desenvolvimento do trato gastrointestinal

O intestino delgado, que tem grande importância no processo de digestão principalmente na absorção de nutrientes é composto pelo duodeno, jejuno e íleo. Nele são liberados os sais biliares produzidos pelo fígado, que fazem a emulsificação das gorduras para que estas possam sofrer ação das enzimas, facilitando a absorção. O pâncreas também libera enzimas que irão atuar na digestão do alimento. O processo de absorção dos nutrientes está diretamente ligado e dependente dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal, pois os monômeros resultantes da digestão dos carboidratos, lipídeos e proteínas só são absorvidos através da atividade de transportadores de membrana. A integridade das células que compõe a mucosa intestinal é de fundamental importância para a absorção de nutrientes (CASTRO, 2005).

A função de digestão e absorção é facilitada pelos vilos intestinais (projeções digitiformes) e pelos microvilos que promovem a absorção de nutrientes do lúmen intestinal para os enterócitos e deste para os vasos sanguíneos ou sistema linfático (STISON e CALHOUN, 1982; STURKIE, 2014). Após a eclosão o trato gastrintestinal sofre grandes alterações, como maturação funcional do intestino, as quais envolvem mudanças morfológicas e fisiológicas que proporcionam um aumento na área de superfície de digestão e de absorção. As alterações morfológicas mais significativas são: aumento do comprimento do intestino, altura e densidade dos vilos e, conseqüentemente, no número de enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas (BARANYIOVA, 1987).

Segundo Moran Junior (2007), nos primeiros 15 dias de vida do pintinho ocorrem a transição completa da superfície entérica e todas as células embrionárias remanescentes são eliminadas. Ainda segundo o autor novas células especializadas para a digestão e absorção não estão completamente desenvolvidas até duas a três semanas após a eclosão.

Imediatamente após a eclosão, os pintinhos utilizam suas limitadas reservas corporais para conseguir um rápido desenvolvimento físico e funcional do trato gastrintestinal, a fim de desenvolver a capacidade de digerir alimentos e assimilar nutrientes (UNI e FERKET, 2004).

Após a eclosão a taxa de proliferação dos enterócitos e a superfície de absorção aumentam, no entanto esse rápido desenvolvimento é diferente ao longo do intestino delgado. Aos sete dias de vida o crescimento dos vilos no duodeno está praticamente completo, enquanto que no jejuno e íleo o desenvolvimento continua além do 14º dia de vida (UNI, *et al.*1999).

Normalmente o desenvolvimento da mucosa intestinal é mensurado pelo aumento da altura e quantidade dos vilos, o que corresponde pelo aumento do número de suas células epiteliais (enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas). Esse processo pode ser melhor compreendido por dois principais eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes (“stem cells”) localizadas na cripta e ao longo dos vilos, e perda de células (extrusão), que ocorre normalmente no ápice dos vilos. O equilíbrio entre esses dois processos determina o “turnover” (síntese – migração - extrusão) constante, ou seja, a manutenção do tamanho dos vilos e, portanto, a manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal (MAIORKA *et al.*, 2002).

Normalmente, quando o intestino é lesionado causando um desequilíbrio no “turnover” ocorre modificação na altura dos vilos. A manutenção da mucosa intestinal, em condições fisiológicas normais, tem custo energético elevado para o frango. Em situação que ocorrem lesões, além da redução da quantidade de substrato digerido e absorvido, há ainda o custo da restauração desse epitélio. Portanto o rendimento econômico do lote estará potencialmente comprometido quando existirem afecções na mucosa do trato gastrintestinal (MAIORKA *et al.*, 2002).

## **2.2 Aditivos controladores de microbiota: antibióticos, probióticos e ácidos orgânicos**

### **2.2.1. Antibióticos**

Antibióticos ou agentes antimicrobianos são, segundo Cromwell (2000), compostos que em concentrações baixas reduzem ou inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis.

Os primeiros estudos que comprovaram os efeitos benéficos da utilização dos antibióticos na alimentação em níveis subterapêuticos para melhorar o desempenho das aves e suínos, foram realizados por Moore *et al.* (1946) e Jukes *et al.* (1950). Desde então os antibióticos tem sido utilizados na alimentação animal com o propósito de garantir a saúde e melhorar o desempenho dos animais.

Os promotores de crescimento antimicrobianos usados na criação animal são constituídos por antibióticos ou quimioterápicos. Os primeiros são substâncias sintetizadas por fungos, bactérias ou actinomicetos, e os segundos, são substâncias produzidas sinteticamente em laboratórios (RANG *et al.*, 2015).

Segundo Butolo (1999), os antimicrobianos administrados em doses elevadas em curtos períodos durante a fase de criação de aves e suínos, quando necessário para tratamento de doenças específicas (terapêutica) não se enquadra na classificação de microingredientes de alimentação. Por outro lado, quando utilizados em pequenas doses no alimento, com a finalidade de prevenir, reduzir ou controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo, melhorando o desempenho, são classificados como pró-nutrientes pertencentes ao grupo de promotores de crescimento. Mais recentemente, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários (DFIP/SDA) denominou o uso de antibióticos e quimioterápicos usados em dosagem subterapêutica na alimentação de animais de produção como aditivos melhoradores de desempenho.

As atividades das bactérias patogênicas em nível intestinal dos animais produzem uma depressão significativa no desempenho das aves. Estudos demonstram que animais com menor desafio microbiológico no que tange a patógenos, apresentam desempenho superior, crescendo mais rapidamente e eficientemente, não respondendo à ação de antibióticos usados como promotores de crescimento. Por outro lado, animais submetidos a situações de produção comercial ou convencional com pequeno intervalo entre lotes, dificuldades com limpeza e desinfecção e por consequência com maior pressão de infecção apresentam desempenho próximo àqueles livres de patógenos, quando receberam antibióticos como promotores de crescimento via ração (BUTOLO, 1999).

As aves recém-eclodidas possuem pouca diversidade da microbiota intestinal, nesse período a probabilidade de colonização por patógenos entéricos no trato gastro intestinal das aves é maior. O efeito negativo decorrente desse processo tem sido em parte contornado com a utilização dos antibióticos como promotores de crescimento, estes por sua vez, são considerados os principais aditivos de uso na alimentação animal, sendo responsáveis pela melhoria na produção animal, principalmente nas fases iniciais de criação das aves (LORENÇON *et al.*, 2007).

De acordo com Corneli (2004), os antibióticos em dosagens subterapêuticas, adicionados na ração, atuam impedindo que os microorganismos patogênicos invadam e se proliferem no trato gastrointestinal do animal, permitindo assim, que os nutrientes da dieta sejam aproveitados para o desenvolvimento do tecido muscular ao invés da estimulação do sistema imune. Dessa forma, os antibióticos em baixa dosagem nas rações, atuam como promotores de absorção intestinal com a denominação atual de aditivos melhoradores de desempenho.

A retirada total dos antibióticos promotores de crescimento pode resultar em menor lucratividade para o setor avícola e isso está respaldado em inúmeros resultados experimentais, pois ocorre uma diminuição média de desempenho de 3 a 7%, com impacto negativo sobre a saúde animal e a mortalidade (TOLEDO *et al.*, 2007). Nesse sentido, a pressão em nível internacional pela proibição do uso de antibióticos em baixa dosagem para

animais de produção coloca em lados opostos a integrantes efetivos da cadeia produtiva, países importadores, produtores de antibióticos e consumidores.

Os antibióticos são classificados segundo vários critérios: pela sua estrutura química (derivados de aminoácidos, derivados de açúcares, entre outras), pela ação predominantemente ou espectro de ação (gram-positivos, gram-negativos, amplo espectro), pela ação biológica (como bactericida e bacteriostático) pela sua origem (bactérias, ascomicetos) e pelo mecanismo de atuação (ação de superfície, bloqueando a biossíntese protéica) (BUTOLO, 2002). Apesar desse conceito, atualmente por razão formulada é permitida apenas uma molécula para aves e suínos no Brasil, ou seja, não é permitido usar o conceito para usar um princípio para gram-positivo e negativo concomitantemente. Especificamente para aves, ainda é permitido o uso de uma molécula ativa visando prevenção e controle de coccidiose.

Os antibióticos autorizados pelo MAPA (2006) como promotores do crescimento no Brasil são: avilamicina, bacitracina metileno disalicilato, bacitracina de zinco, colistina, enramicina, flavomicina, halquinol, lasolacida, lincomicina, monensina, narasina, salinomicina, tiamulina, tilosina e virginiamicina.

### **2.2.2. Probióticos**

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Ao longo do tempo, esta denominação teve diferentes acepções. Lilly e Stillwel (1965) a usaram para denominar substâncias secretadas por um protozoário que estimularam o crescimento de outros e Parker (1974), para denominar suplementos alimentares destinados a animais, incluindo microrganismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal.

Havenaar e Huis In’T Veld (1992) consideraram que são culturas únicas ou mistas de microrganismos que, administrados a animais ou humanos, produzem efeitos benéficos no hospedeiro por incremento das propriedades da microbiota nativa. Esses autores restringiram o uso desse

termo a produtos que contenham microrganismos viáveis que promovem a saúde de humanos ou animais, e que exercem seus efeitos no aparelho digestivo, no trato respiratório superior ou no trato urogenital.

Segundo Schrezenmeir e De Vrese (2001) o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada que alteram a microbiota própria das mucosas por colonização de um sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde. Os principais microrganismos bacterianos considerados como probióticos são aqueles dos gêneros *Lactobacillus* e *bifidobacterium*, além de *Escherichia*, *Enterococcus* e *Bacillus* (MORAIS e JACOB, 2006).

Em um estudo feito por Meurer *et al.* (2010), com intuito de avaliar os efeitos do uso de probiótico *Bacillus subtilis* adicionados a dietas contendo ou não antibióticos promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte, constatou que as aves que foram alimentadas com rações contendo probióticos e ou antibióticos apresentaram melhor conversão alimentar, quando comparadas com as aves que receberam a dieta sem aditivos. As aves que receberam dietas contendo *Bacillus subtilis* apresentaram, melhor conversão alimentar, maior ganho de peso e maior consumo de ração. No entanto, Pelicano *et al.* (2003) em um trabalho comparativo de dietas com diferentes probióticos não observaram benefícios na morfologia intestinal das aves.

Muitos benefícios dos probióticos já foram descritos em trabalhos científicos como a capacidade de alojar-se e se multiplicar no trato intestinal, atuando como promotor de absorção e beneficiando a saúde do hospedeiro, proporcionando melhor conversão alimentar, maior ganho de peso e maior consumo de ração. Outros trabalhos também demonstram que estes aditivos estimulam propriedades já existentes na microbiota natural do trato digestório (SILVA, 2000), promovem a eliminação competitiva de microrganismos indesejáveis, favorecendo um bom equilíbrio entre os microrganismos benéficos (LORENÇON *et al.*, 2007), atuam como antígenos, estimulando o sistema imune das aves e fornecer constituintes ativos contra bactérias patogênicas no trato gastrintestinal (PAZ, 2006), e ainda são citados como uma alternativa ao uso de antibióticos, sem qualquer questionamento no que tange a resistência bacteriana (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Independentemente do critério para a sua utilização, os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem eventual resistência às drogas ou seleção de microorganismos resistentes aos princípios ativos dos antibióticos (NEPOMUCENO e ANDREATTI, 2000), o que os faz um dos principais candidatos para substituir os antimicrobianos como aditivos alimentares.

A ação dos probióticos pode ser explicada através de alguns mecanismos como a produção de substâncias antimicrobianas e ácidos orgânicos, proteção aos vilos e superfícies absorptivas contra toxinas produzidas por microorganismos patogênicos, bem como estímulo ao sistema imune (WALKER e DUFF, 1998).

O epitélio intestinal, geralmente age como uma barreira natural contra bactérias patogênicas e substâncias tóxicas presentes na luz intestinal. Distúrbios na microbiota normal ou nas células epiteliais intestinais, causados por algum tipo de estresse, patógenos, substâncias químicas e radiação, podem alterar a permeabilidade desta barreira natural, facilitando a invasão de patógenos e outras substâncias nocivas, modificando o metabolismo, a capacidade de digestão e absorção de nutrientes e causando ainda inflamações crônicas na mucosa intestinal (HOFSTAD, 1988; PODOLSKY, 1993; OLIVEIRA, 1998). Por estes motivos é entendido o papel de proteção da mucosa intestinal realizado por parte dos probióticos.

Como os processos de absorção de nutrientes são totalmente dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal, a manipulação de microorganismos probióticos (suplementos microbianos vivos formados por bactérias ou fungos específicos) dentro do trato gastrointestinal tem sido usada com o objetivo de melhorias no desempenho e, conseqüentemente na eficiência energética do intestino (PELICANO *et al.*, 2003). Segundo Houdijk *et al.* (1999), a utilização dos probióticos propicia a colonização do trato digestivo, mantendo ou incrementando a microbiota natural, prevenindo a colonização de microorganismos patogênicos e mantendo a ótima utilização dos nutrientes da ração.

A cada ano que passa a ave usada em escala agroindustrial muda um pouco a sua genética, com o esforço dos profissionais e ao mesmo tempo, se inclui mais tecnologias em ingredientes na sua dieta. Os aviários estão sendo mais modernos proporcionando melhor ambiência para que a ave expresse o

seu máximo potencial genético. Provavelmente se todos estes fatores somados à biossegurança fossem excelentes diminuiríamos bastante o potencial de desafio de doenças acometerem estas aves. No entanto existem estudos que demonstram o efeito modulador dos aditivos alternativos da dieta sobre a resposta imunológica da ave. Alguns nutrientes têm a capacidade de interferir na resposta imune por terem efeito regulatório direto sobre os leucócitos, alterando os índices de proliferação, padrão de produção de citocinas e diferenciação de populações leucocitárias específicas.

Murarolli (2008) afirma que além dos aditivos alternativos como os prebióticos, probióticos e simbióticos estarem substituindo os antibióticos na alimentação animal atual, e estarem promovendo uma modulação benéfica da microbiota intestinal, observa-se também uma diminuição do estresse imunológico. Em um estudo comparativo com adição de aditivos alternativos às dietas, prebióticos, probióticos e simbióticos para frangos de corte observou-se efeito de prebiótico para a resposta vacinal contra a doença de Newcastle aos 28 dias e também efeito para o peso relativo de baço.

Em outro estudo, Bittencourt (2006) observou maiores títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle em frangos de corte que receberam probióticos em relação ao grupo que recebeu antibiótico e o controle. Da mesma forma o Zulkifli *et al.* (2000) ao avaliarem os títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle, observaram os maiores valores de títulos no tratamento com probiótico em relação ao controle, mas não diferindo do tratamento com antibiótico porém estes resultados foram observados apenas após período de exposição à alta temperatura, o que reforça o argumento de que os benefícios do probiótico são intensificados em situações de estresse.

Balevi *et al.* (2001) não observaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ), ao avaliarem o efeito de um probiótico comercial na resposta imune humoral de galinhas poedeiras e atribuíram a ausência de estímulo ao uso de microorganismos não específicos para a espécie em estudo. Nunes (2008) avaliou a adição na dieta de prebiótico e probiótico e encontrou maiores valores de títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle.

### 2.2.3. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos se encontram amplamente distribuídos na natureza como constituintes habituais nos tecidos vegetais e animais. Também são produzidos a partir da fermentação microbiana dos hidratos de carbono, principalmente no intestino grosso (SANCHES, *et al.* 2006).

Ácidos orgânicos são substâncias que contêm uma ou mais carboxilas em sua molécula (PENZ *et al.* 1993). Nessa classificação podem ser incluídos os aminoácidos e os ácidos graxos. Em geral, quando o termo ácido orgânico é empregado na produção animal, refere-se aos ácidos fracos, de cadeia curta (C1-C7) (DIBNER e BUTTIN, 2002), que produzem menor quantidade de prótons por molécula ao se dissociarem. Por serem expressos em logaritmo, uma unidade de pH acima do pKa de um ácido, indica que 90% do ácido encontra-se na forma não dissociada e, com 2 unidades de pH acima do pKa, 99% do ácido estará não dissociado. Isso é particularmente importante no processo digestivo, pois na dependência do pH dos compartimentos digestivos haverá ação ou não do ácido em questão (SANCHES, *et al.* 2006).

Produzem acidez, a qual age como flavorizante, e retardam a ação enzimática e o esvaziamento gástrico (RAVINDRAN e KORNEGAY, 1993), dando sensação de saciedade; são fonte de energia e estimulam reações metabólicas, aumento da digestibilidade de nutrientes e melhoram a morfologia intestinal (PARTANEN e MROZ, 1999). Agem diretamente como inibidores do crescimento bacteriano, podendo ser utilizados na conservação de grãos e alimentos, sanitização do alimento e aditivo promotor de crescimento alternativo em dietas para animais.

Entre os objetivos dos ácidos orgânicos, está o auxílio na manutenção do pH intestinal, permitindo a ativação e correto funcionamento das enzimas proteolíticas. Além disso, os ácidos orgânicos estimulam o consumo e o ganho de peso (VIOLA, *et al.* 2008). Também há um efeito antibacteriano específico à semelhança dos antibióticos, principalmente para ácidos orgânicos de cadeia curta, sendo particularmente efetivos contra *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter* (DIBNER e BUTTIN, 2002; RICKE, 2003). A ação antimicrobiana se dá porque o ácido diminui a capacidade de aderência da

fímbria da bactéria à parede intestinal, tendo ainda forte capacidade de desnaturação sobre as proteínas, capacidade aniônica tamponante com cátions das dietas ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ), aumentando a digestibilidade e retenção desses elementos e ainda pela utilização da energia do ácido no metabolismo conforme demonstrado por Hume *et al.* (1991) com ácido propiônico.

As funções dos ácidos orgânicos, segundo Adams (1999) são muito diferentes e nem todas relacionadas à nutrição. Atuam como agentes quelantes que se ligam a metais formando os quelatos metálicos, os quais previnem ou reduzem a oxidação oriunda da catálise dos metais-íons. Agem diretamente como fortes inibidores do crescimento microbiano podendo ter uso na preservação de grãos e rações, sanitização da carne e como aditivo promotor de crescimento na ração.

A utilização de ácido orgânico na alimentação de frangos de corte reduz o desafio microbiano sobre a mucosa intestinal, auxiliando a manutenção da integridade da mucosa, melhorando a capacidade de utilização do alimento pelos animais. Um dos principais efeitos benéficos da adição de ácidos orgânicos na dieta de frango de corte está relacionado com a seleção da microbiota benéfica como *Lactobacillus*, principalmente no período pós-eclosão, a carga e a população microbiana nesse período irão definir a característica populacional do trato gastrointestinal (FERNANDES *et al.* 2014; FRANCO, 2009).

Dentre os ácidos orgânicos de cadeia curta, os mais comumente utilizados para alimentação animal são: ácido acético, propiônico, butírico, fumárico e láctico. A maioria desses ácidos encontra-se disponíveis como sais principalmente de sódio e cálcio. O butirato de sódio, por exemplo, é um sal derivado do ácido butírico apresenta-se na forma sólida o que facilita a sua inclusão em dietas de frango de corte (FERNANDES *et al.*, 2014). O butirato também conhecido como sal do ácido butírico é considerado, segundo Scheppach *et al.* (1996), um nutriente de extrema importância, por ser capaz de promover aumento na proliferação celular e manter a integridade do epitélio ao longo do trato gastrointestinal.

Os ácidos orgânicos são considerados como fontes de energia prontamente disponível na mucosa intestinal dos animais não-ruminantes, o

que explica o fato de contribuírem com os enterócitos proporcionando o aumento do número de altura das vilosidades e conseqüente maior superfície de absorção de nutrientes (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2004). Segundo Ribeiro *et al.* (2008), os ácidos orgânicos promovem leve acidificação da dieta reduzindo o pH da digesta e órgãos do estômago, proventrículo e moela, favorecendo aumento na ação da pepsina na digestão dos peptídeos.

A suplementação de ácidos orgânicos em dietas de frangos apresenta resultados conflitantes quanto ao desempenho, provavelmente em decorrência da diferença entre a mistura de ácidos, modo de ação, dosagem, condições ambientais e características avaliadas (FRANCO, 2009).

Os ácidos orgânicos segundo Ricke (2003) tanto na presença como na ausência de promotores de crescimento, são capazes de potencializar ganho de peso e conversão alimentar de frangos de corte, o que possibilita a utilização dos ácidos orgânicos como uma alternativa frente aos antibióticos, porem ainda é necessário à realização de pesquisas que visem fundamentar a sua aplicabilidade em escala agroindustrial.

## **2.3 Doença de Newcastle**

### **2.3.1 Características do vírus e a Doença de Newcastle**

O vírus da doença de Newcastle (VDN) é um vírus que faz parte de um gênero descrito recentemente, chamado de *Avulavírus* pertencente à família dos Paramyxoviridae, sorotipo 1 (APMV-1) (ALEXANDER, 2003; RAUW, *et al.* 2009). Nesta família, os vírus são formados por RNA de fita simples, envelopado e não segmentado.

O genoma do VDN é composto de seis genes que codificam as seis proteínas estruturais: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (FP), matriz (M), de fusão (F), hemaglutinina-neuraminidase (HN), e a polimerase do RNA (P\_RNA) (CHAMBERS *et al.*, 1986).

A virulência da estirpe do VDN é dependente de vários genes. O sítio de clivagem da proteína de fusão é o local mais importante por ser responsável pelas mudanças na virulência (MILLER *et al.*, 2010). O envelope viral apresenta duas projeções glicoprotéicas típicas, a hemaglutinina neuraminidase (HN) e a proteína de fusão F, que recobrem toda a sua superfície, e são importantes para a identificação e comportamento do vírus, além de exercerem importante papel no desencadeamento da resposta imune protetora induzida pelo VDN nas aves (SANTOS *et al.*, 1996; USAHA, 2008; PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2000).

O VDN é capaz de aglutinar as células vermelhas do sangue (hemácias) devido a proteína de superfície neuraminidase hemaglutinina (HN) que se liga aos receptores na superfície de hemácias. A proteína F do VDN permite a fusão das membranas do vírus e da célula infectada para a transferência do material genético do vírus para dentro da célula (ALEXANDER, 2003).

As estirpes do VDN são agrupadas em cinco patótipos, com base na severidade dos sinais clínicos produzidos em aves infectadas. O patótipo entérico assintomático consiste em uma infecção entérica subclínica, o patótipo avirulento é denominado lentogênico ou vacinal, forma que se apresenta com infecção respiratória leve ou subclínica, o patótipo com virulência intermediária é conhecido como mesogênico, que se apresenta com sinais respiratórios, sintomas nervosos ocasionais, mas baixa mortalidade e o patótipo altamente virulento é denominado velogênico, uma forma que se apresenta com alta mortalidade, normalmente após sinais respiratórios e nervosos. Esse último patótipo é subdividido em dois tipos: velogênico neurotrópico e velogênico viscerotrópico (ALEXANDER, 1995; HUANG *et al.*, 2004; ALEXANDER e JONES, 2003; PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2007).

A DNC (Doença de Newcastle) é uma doença altamente contagiosa e aguda, tendo como agente etiológico, como já relatado, o paramixovírus, o qual se encontra difundido de forma ampla no ambiente, afetando diferentes espécies de aves e, as criações em grandes densidades são as mais susceptíveis (ALBINO e TAVERNARI, 2008).

De acordo com Arns *et al.* (2012), esta doença é um dos principais problemas sanitários da avicultura mundial, pois, além de ser altamente contagiosa, produz sinais respiratórios, acompanhados de manifestações

nervosas, diarreia, edema de cabeça, cursando com alta morbidade e mortalidade. A DNC pode induzir sinais de depressão, prostração, edema da cabeça e barbelas, mas a sintomatologia pode variar de clinicamente inaparente para formas altamente virulentas, dependendo da estirpe do vírus e espécies hospedeiras (RAUW, *et al.* 2009).

### **2.3.2 Medidas de controle da Doença de Newcastle**

As medidas de controle da doença de Newcastle no Brasil por parte da cadeia produtiva não são exclusivas para a doença, elas fazem parte de um conjunto de medidas de biossegurança e programas de vacinação que visam à proteção do lote contra as principais doenças da Avicultura. Como legislação oficial o Ministério da Agricultura (MAPA), através da Instrução Normativa 17, publicada em 2006, direciona através do Plano de Emergência Sanitária de Influenza e Newcastle as medidas de controle a serem tomadas de forma preventiva, assim como em casos suspeitos com a necessidade de notificação imediata.

A biossegurança nas criações avícolas visa prevenir as doenças e devem ser considerada essencial desde a fase de planejamento das granjas e núcleos de aviários. Os lotes devem ser bem preparados, separados, devem ser respeitadas as distâncias mínimas do incubatório e das granjas e das outras criações, se houver. Todos os cuidados com os itens de bem estar animal somados a boas medidas de biossegurança vão melhorar o status sanitário dos plantéis diminuindo a probabilidade de disseminação de qualquer doença nos plantéis (FAO, 2004). ALEXANDER e JONES (2003) reforçam que o controle da doença de Newcastle deve ir além dos cuidados com a biossegurança nas propriedades, mas também acompanhada de uma boa higiene das instalações.

A vacinação dos lotes é mais uma ferramenta para controle da doença de Newcastle. Os programas vacinais variam em cada região do Brasil e são definidos de uma forma geral pelo desafio da doença na região e ou como

forma de demonstração de bom status sanitário para manutenção das exportações de frango e subprodutos.

### **2.3.3 Tipos de vacinas contra a Doença de Newcastle**

As vacinas contra a DNC podem ser vivas ou mortas. As vacinas vivas são feitas com vírus vivos e são capazes de infectar as células. Normalmente são utilizadas estirpes de virulência baixa ou moderada para produção destas vacinas. No processo de imunização elas imitam a infecção natural e induzem todas as formas de respostas imunes. Nas vacinas mortas ou inativadas a capacidade do vírus de infectar as células foi destruída por tratamento com uma substância química, de radiação ou de calor. Estas vacinas induzem somente produção de resposta de anticorpos em circulação (FAO, 2002).

As vacinas vivas para a doença de Newcastle podem ser divididas em três grupos distintos: mesogênicas, lentogênicas e entérotóxicas apatogênicas. Tal classificação se baseia no grau de patogenicidade das cepas vacinais. As estirpes entéricas apatogênicas se replicam principalmente no trato intestinal, embora também tenham alguma replicação no trato respiratório e, portanto, induz imunidade local eficaz (SATRA, *et al.* 2011).

As estirpes V4, PHY.LMV.42, Ulster 2C e VH do vírus Newcastle são enterotóxicas apatogênicas utilizadas como vacinas. Já as estirpes Hitchner B1, VG/GA e La Sota também são utilizadas para fabricação de vacinas, classificadas como lentogênicas e tem tropismo pela replicação em tecido respiratório, assim como as estirpes Komarov e Roakin, que são estirpes mesogênicas utilizadas também para a fabricação de vacinas contra a doença de Newcastle (GUITTET *et al.*, 1997).

Segundo Orsi (2010) todas as vacinas utilizadas no mercado brasileiro contra a doença de Newcastle, lentogênicas e entéricas apatogênicas mostraram-se eficazes.

A Tabela 1 resume estas estirpes do vírus Newcastle utilizadas como vacinas e o seu Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC):

**Tabela 1.** Classificação das cepas Vacinais contra Doença de Newcastle

<b>Estirpe viral</b>	<b>IPIC</b>	<b>Classificação</b>
V4	0,0	Enterotrópica apatogênica
PHY.LMV.42	0,0 – 0,16	Enterotrópica apatogênica
Ulster 2C	0,0(0,14-0,23)	Enterotrópica apatogênica
VH	0,15	Enterotrópica apatogênica
Hitchner	0,20	Lentogênica
VG/GA	0,35	Lentogênica
La Sota	0,40	Lentogênica
Komarov	1,41	Mesogênica
Roakin	1,45	Mesogênica

Fonte: ALEXANDER e JONES (2003)

É importante o conhecimento das estirpes vacinais disponíveis para propor um programa de vacinação eficaz. A indução de resposta imunológica tende a aumentar à medida que a patogenicidade da vacina viva aumenta, no entanto, quando se trata de vacinas de tropismo respiratório as reações pós-vacinais (RPV) também são aumentadas na mesma proporção. As RPVs devem ser controladas ou evitadas, pois suas reações podem ser intensificadas e em situações de estresse da ave, como falhas de ambiência no manejo inicial dos pintinhos, como fumaça de alguns sistemas de aquecimento, falta de renovação de troca de ar e o próprio calor impactarão negativamente sobre a saúde do lote o por consequência sobre o desempenho. Estas RPVs mais intensificadas podem deixar a ave mais susceptível a infecções respiratórias secundárias que normalmente requer tratamento com antibióticos, diminuição do consumo de ração, menor desempenho, contaminação secundária e consequente aumento de condenação no frigorífico (TAMAS *et al.*, 2004).

As perdas decorrentes destas RPVs já são vistas pelos produtores como um fator constante de comprometimento da rentabilidade da atividade avícola e, por esta razão, os laboratórios fabricantes de vacina têm investido no desenvolvimento de produtos que promovam a proteção e que sejam mais seguros ao mesmo tempo. Tamas *et al.* (2004) sinaliza que as reações respiratórias devido à rolagem de vírus estão fortemente relacionadas com a característica patogênica da estirpe viral utilizada.

Segundo Alexander (2003), se as aves não forem vacinadas uniformemente com uma contra DNC com vacina viva ou se outra vacina viva interfere na proteção contra DNC as aves não vacinadas estão susceptíveis a

doença respiratória. Isto se deve a um fenômeno conhecido como “rolagem de vírus vacinal”. Como o vírus passa de ave para ave, neste caso de uma ave vacinada para outra ave que não foi vacinada, o quadro de reação ou mesmo infecção do vírus vacinal em uma ave que não foi vacinado é mais intenso e grave, que não se espera em uma reação vacinal normal. Acredita-se que os vírus envolvidos em reações pós-vacinais de rolagem são sempre de origem vacinal, no entanto não se realiza a caracterização genômica destes isolados, portanto o envolvimento de um vírus de Newcastle de aves selvagens nestas reações de rolamento não pode ser descartado (MILLER, et al. 2010).

Todos os vírus, de campo e vacinais podem ser submetidos a um teste de patogenicidade viral. Originalmente, estirpes dos VDN foram diferenciadas de acordo com o tempo de morte médio de embriões de galinha ou em testes in vivo utilizando doença ou morte como indicador. Diferentes vias de infecção podem ser usadas nestes testes: a via intracerebral em pintos com um dia de idade para determinação do Índice de Patogenicidade Cerebral (IPIC) e a via intravenosa em frangos com seis semanas de idade para avaliar o Índice de patogenicidade intravenosa (IPIV). Estes índices são calculados de acordo com a gravidade dos sintomas da doença. O teste de IPIV é particularmente útil para determinação das estirpes dos isolados do VDN, em moderada e altamente virulenta, mas tende a não mostrar distinção entre alguns vírus mesogênicos e lentogênicos. O IPIC é o escore médio de cada ave/por observação em 24h, durante oito dias (KOUWENHOVEN, 1993, ALEXANDER, 1995). Na União Europeia, os isolados do VDN com pontuação IPIC maior do que 0,7 são considerados virulentos (AL-GARIB *et al.*, 2003).

A doença de Newcastle, chamada velogênica, com (IPIC) acima de 0,7 faz parte da lista da OIE (World Organization for Animal Health) e é de notificação obrigatória para os países signatários da Organização Mundial do Comércio (OMC).

A eficiência da vacina contra a doença de Newcastle de cepa enterotrófica apatogênica não é questionada e sua proteção já foi bastante estudada. No entanto não são vistos muitos trabalhos sobre a replicação do vírus no intestino e se existe algum efeito mensurável na morfometria intestinal que possa ser modificada pelo efeito da vacina, assim como, eventualmente, se este efeito pode causar alguma perda em desempenho zootécnico.

### 2.3.4 Os programas vacinais e os níveis de proteção

Os programas de vacina contra a doença de Newcastle no Brasil para frangos de corte envolvem o uso de vacinas vivas e vetorizadas com o vírus de Marek. Estes programas contemplam aplicações de vacinas somente no incubatório, com dose única; somente no campo com dose única; no incubatório e no campo e em algumas empresas não ocorrem a vacinação contra a doença de Newcastle. Existem controvérsias para a necessidade da vacina nos primeiros dias de vida do frango devido à alta taxa de anticorpos maternos que protegem a ave nestes primeiros dias. Fernandes *et al.* (2013) e Rauw *et al.* (2009) afirmam que estas vacinas (no incubatório ou na primeira semana de alojamento) poderiam ser inativadas por estes anticorpos maternos.

Segundo Rauw *et al.* (2010) os títulos médios geométricos (GMT) para Newcastle em prova sorológica de HI dos frangos de corte das três primeiras semanas de vida são, provavelmente, de origem de transferência de imunidade passiva pela matriz. Neste sentido, Murarolli (2008) também afirma que as médias de títulos de anticorpos até as duas primeiras semanas de vida do frango são considerados anticorpos passivos (de origem materna).

Em um trabalho realizado por Fernandes *et al.* (2013) no qual a vacinação precoce no primeiro dia de idade dos pintos de corte com vacina a base de oocistos vivos de *Eimeria spp*, verificou-se que a vacinação não induziu uma resposta imune ativa, provavelmente houve interferência dos altos títulos de anticorpos maternos sobre a vacinação precoce. A resposta imune humoral requer proliferação de linfócitos durante vários dias antes de contribuir significativamente na proteção do hospedeiro de forma ativa.

Por outro lado Rauw *et al.* (2009) afirmam que altos níveis de anticorpos transferidos por imunidade materna, para a doença de Newcastle, observados atualmente, interferem numa boa soroconversão, a títulos de produção de anticorpos ativos que seria induzida pela vacina administrada nos primeiros dias. Bennejean *et al.* (1978) também afirmava que os anticorpos maternos, que são transmitidos através da gema, podem, se o nível for muito alto,

interferir com o desenvolvimento de uma imunidade ativa, ou seja, por anticorpos circulantes.

De acordo com Zakay-Rones e Levy (1973) os anticorpos maternos não interferem sobre a vacinação no que se refere à proteção local de mucosas conferida pela vacinação, o que explica a proteção conferida pelos programas vacinais atuais de frango de corte, em que as vacinas são administradas nos pintinhos de um dia ainda nos incubatórios sem receber reforço de vacina durante toda a sua vida produtiva. Em um trabalho feito pelo Russell e Kock (1993) com aves vacinadas com cepas vivas de Newcastle (traqueotrópicas e enterotrópicas) no primeiro dia, comprovou-se que a imunidade local promovida pela vacina, através dos títulos médios de IgA, 10 dias após a vacinação, nos líquidos corporais; bile, lágrimas e soro.

A produção de anticorpos de mucosa específicos contra Newcastle pode ser entendida pelo estudo de Perozo *et al.* (2008) no qual foi feita uma avaliação de distribuição do vírus vacinal, proveniente de duas vacinas vivas (La Sota e VG/GA) pelos tecidos de aves SPF através da técnica de identificação molecular por PCR. As duas estirpes do vírus usadas na vacinação foram detectadas nos tratos respiratórios e intestinais, no entanto a cepa tem um tropismo preferencial pelo primeiro tecido. As duas cepas vacinais induziram produção local de imunoglobulina A (IgA) específica contra a DN no trato respiratório superior, no entanto, os maiores níveis de IgA foram conferidos pela estirpe La Sota, enquanto os níveis de IgA foram mais altos na bile e intestino das aves vacinadas com a cepa VG/GA.

As estirpes virais Hitchner B1 e Ulster da doença de Newcastle (NDV) promoveram título elevado na glândula de Harder após a vacinação por gota ocular. Desde então esta glândula tornou-se o principal local das células formadoras de anticorpos IgA antivirais no corpo e o seu número correlacionado com o nível de anticorpo IgA nas lágrimas. No baço, glândula de Harder e na medula óssea femoral continuam níveis comparáveis de células formadoras de anticorpos IgG e IgM após duas inoculações intra-oculares de vírus, enquanto que a tonsila cecal e bolsa cloacal continha poucas células formadoras de anticorpos apesar da replicação local da estirpe Ulster ter tido maiores títulos de vírus nas fezes (RUSSELL e KOCK, 1993).

A proteção conferida pela vacinação precoce com as cepas VG/GA e La Sota em frangos de corte desafiados com cepas letais de Newcastle foi descrita por Perozo *et al.* (2008) quando as vacinas proporcionaram 95% a 100% de proteção apesar da presença de anticorpos maternos nos primeiros dias.

Os estudos tem mostrado que a imunidade de mucosas representadas pelas imunoglobulinas A (IgA) desempenha um papel importante no desenvolvimento de proteção em aves vacinadas contra a doença de Newcastle (REYNOLDS e MARAGA, 2000; SCOTT, 2004; SEAL *et al.*, 2000).

A produção de anticorpos na mucosa está intimamente relacionada com a replicação viral nas células alvo, com tropismo do vírus vacinal pelo tecido, e, portanto uma forma de avaliar a eficácia frente a um desafio direto (JAYAWARDANE e SPRADBROW, 1995). O tropismo intestinal da estirpe VG/GA e o consequente indução de imunidade local pode ser importante para a proteção contra as estirpes velogênicas-viscerotrópico de NC que são capazes de induzir a destruição maciça das áreas linfóides intestinais e extensa ulceração do epitélio intestinal associada a replicação viral ativa (BROWN *et al.*, 1999).

Não se conhece ao certo sobre a replicação dos vírus vacinais enterotrópicos na mucosa do intestino. Não se sabe exatamente qual é o nível de tropismo destes vírus, que tipo eventual de microlesão nas vilosidades intestinais ele poderia proporcionar e se por ventura estas alterações influenciariam na absorção dos nutrientes, consequentemente no desempenho zootécnico das aves.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Localização, registro de experimentação e época de realização**

O experimento foi realizado no Aviário Experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB/UFRB), localizado no município de Cruz das Almas, Bahia.

Todos os procedimentos realizados neste estudo seguiram padrões e normas vigentes de acordo com as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi registrado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CEUA/UFRB) com o número 23007.000657/2015-05.

#### **3.2 Aves e instalações**

Foram utilizadas 864 pintinhas de um dia de idade, da linhagem Cobb-500®, fêmeas, obtidos de incubatório comercial previamente vacinadas contra as doenças de Marek, Gumboro e Bronquite infecciosa. As aves foram alojadas em aviário convencional de alvenaria (20x8 metros de comprimento por largura) com tela anti-passarineira. O aviário era subdividido em boxes experimentais, com área de 3,13 m<sup>2</sup> (1,72 x 1,82), os quais foram equipados com um comedouro tubular e um bebedouro pendular. No experimento foram utilizados 24 boxes nos quais alojou-se 36 aves em cada. Para aquecimento inicial das aves foram utilizadas campânulas a gás. Adotou-se o programa de iluminação crescente com 23 horas de luz na primeira semana e 14 horas de luz na 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semana.

A temperatura e a umidade relativa foram monitoradas diariamente por meio de termo-higrômetro, localizado na parte central do galpão. A partir dos dados coletados diariamente foram calculadas as médias semanais de

temperatura e umidade relativa do ar mínima e máxima. Durante o período experimental a temperatura mínima média correspondeu a  $21,7 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$  e a máxima média de  $29,1 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ , enquanto a umidade relativa mínima e máxima média foi de  $59,6 \pm 5,5\%$  e  $83,3 \pm 4,0\%$ , respectivamente.

### 3.3 Delineamento e tratamentos experimentais

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com distribuição dos tratamentos em esquema fatorial 2x2, no qual foram avaliadas duas vacinas comerciais vivas enterotrópicas apatogênicas contra a doença de Newcastle (cepas: PHY.LMV.42 e Ulster) associadas a duas dietas com diferentes suplementações de aditivos, sendo uma contendo apenas aditivo antimicrobiano usado como melhorador de desempenho convencional (AMD) e outra com adição de *Bacillus subtilis* e butirato de sódio protegido como aditivos alternativos equilibradores de microbiota intestinal (AAEMI) em associação ao AMD convencional (ADM + AAEMI).

**Tabela 2.** Tratamentos utilizados de acordo com o tipo de vacina e nutrição

Tratamento	Vacina comercial	Aditivos na ração
1	PHY.LMV.42	AMD* convencional
2		AMD + AAEMI**
3	Ulster	AMD convencional
4		AMD + AAEMI

\*AMD – Aditivo melhorador de desempenho (Enramicina - 10mg/kg de ração).

\*\*AAEMI - Probiótico - *Bacillus subtilis* (Cepa 3102 –  $3 \times 10^5$  UFC/g de ração) e Ácido orgânico - Butirato de sódio protegido (150 g/t do princípio ativo).

As rações experimentais foram elaboradas a base de milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos, sendo formuladas para serem isonutritivas (variando-se apenas o uso dos AAEMI em função dos tratamentos ao longo do experimento). Adotou-se as recomendações nutricionais propostas por Bertechini (2012) com o uso de um programa alimentar composto por duas rações, de acordo com a fase de criação (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3.** Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais da fase pré-inicial

Ingredientes (%)	Diets experimentais (1 a 10 dias)	
	AMD convencional	AMD + AAEMI
Milho	59,455	59,355
Farelo de soja	34,480	34,495
Farinha de carne e ossos	2,939	2,942
Óleo de soja	1,152	1,164
Calcário	0,326	0,326
Sal	0,461	0,461
MHA-Metionina <sup>1</sup> (84%)	0,368	0,368
L-lisina HCl (78%)	0,227	0,227
L-Treonina (98%)	0,023	0,023
Premix vitamínico <sup>2</sup>	0,120	0,120
Premix mineral <sup>3</sup>	0,050	0,050
Cl-colina (60%)	0,096	0,096
Fitase (10.000 ftu/g)	0,005	0,005
Narasina (10%)	0,050	0,050
<b>Enramicina (8%)</b>	<b>0,012</b>	<b>0,012</b>
<b>Butirato de sódio (30%)</b>	-	<b>0,050</b>
<b><i>Bacillus subtilis</i> (10<sup>9</sup> UFC/g)</b>	-	<b>0,030</b>
Total	100,000	100,000
Níveis nutricionais calculados		
Proteína bruta (%)	21,91	21,91
EMAn (Kcal/kg)	2970	2970
Cálcio (%)	0,753	0,753
Sódio	0,217	0,217
Fósforo disponível (%)	0,347	0,347
Lisina (%)	1,317	1,317
Metionina + cistina (%)	0,945	0,945
Treonina (%)	0,856	0,856

<sup>1</sup>MHA Metionina Hidroxi Análoga;

<sup>2</sup>Premix vitamínico - Níveis de garantia/kg do produto: Vitamina A 10.000.000 UI; Vit. E 40.000 UI; Vit. K<sub>3</sub> 3.000mg; Vit B<sub>1</sub> 2.000mg; Vit B<sub>2</sub> 7.000mg; Vit. B<sub>6</sub> 5.000mg; Vit. B<sub>12</sub> 20.000µg; Ac. Fólico 1.500mg; Ac. Pantotênico 15.000 mg; Niacina 50.000mg; Biotina 100mg; Selênio 250mg, Anti-oxidante 125mg.

<sup>3</sup>Premix micromineral - Níveis de garantia/kg do produto: Mn 160g; Zn 100g; Fe 100g; Cu 20g; I 2.000mg.

**Tabela 4.** Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais da fase inicial

Ingredientes (%)	Dietas experimentais (11 a 21 dias)	
	AMD convencional	AMD + AAEMI
Milho	61,310	61,207
Farelo de soja	31,813	31,831
Farinha de carne e ossos	3,248	3,248
Óleo de soja	1,969	1,981
Calcário	0,288	0,288
Sal	0,440	0,432
MHA-Metionina <sup>1</sup>	0,349	0,349
L-lisina HCl (78%)	0,234	0,234
L-Treonina (98%)	0,026	0,026
Premix vitamínico <sup>2</sup>	0,120	0,120
Premix mineral <sup>3</sup>	0,050	0,050
Cl-colina (60%)	0,086	0,086
Fitase (10.000 U/g)	0,005	0,005
Narasina (10%)	0,050	0,050
<b>Enramicina (8%)</b>	<b>0,012</b>	<b>0,012</b>
<b>Butirato de sódio (30%)</b>	-	<b>0,050</b>
<b><i>Bacillus subtilis</i> (10<sup>9</sup> UFC/g)</b>	-	<b>0,030</b>
Total	100,000	100,000
Níveis nutricionais calculados		
Proteína bruta (%)	20,98	20,98
EMAn (Kcal/kg)	3.050	3.050
Cálcio (%)	0,716	0,716
Sódio	0,210	0,210
Fósforo disponível (%)	0,434	0,434
Lisina (%)	1,259	1,259
Metionina + cistina (%)	0,903	0,903
Treonina (%)	0,821	0,821

<sup>1</sup>MHA Metionina Hidroxi Análoga;

<sup>2</sup>Premix vitamínico - Níveis de garantia/kg do produto: Vitamina A 10.000.000 UI; Vit. E 40.000 UI; Vit. K<sub>3</sub> 3.000mg; Vit B<sub>1</sub> 2.000mg; Vit B<sub>2</sub> 7.000mg; Vit. B<sub>6</sub> 5.000mg; Vit. B<sub>12</sub> 20.000µg; Ac. Fólico 1.500mg; Ac. Pantotênico 15.000 mg; Niacina 50.000mg; Biotina 100mg; Selênio 250mg, Anti-oxidante 125mg.

<sup>3</sup>Premix micromineral - Níveis de garantia/kg do produto: Mn 160g; Zn 100g; Fe 100g; Cu 20g; I 2.000mg.

As rações experimentais foram preparadas e estocadas em sacos de nylon e armazenadas em sala isenta de incidência de luz solar. As rações e a água foram fornecidas à vontade em todo o período experimental. Os tratamentos foram sorteados para cada parcela experimental.

### **3.4 Vacinas e Vacinação**

A vacinação dos pintinhos foi feita com vacina liofilizada, uma gota vacinal via ocular. As vacinas foram reconstituídas em diluente ocular (específico para aplicação ocular) na proporção de 30 mL/1000 doses vacinais, correspondente a 0,03mL (30 µL) de dose vacinal por pintinho. Na chegada ao aviário experimental, antes de serem alojados nos boxes, os pintinhos foram vacinados por via ocular individualmente contra a doença de Newcastle com cepa entérica apatogênica; PHY.LMV.42 ou Ulster.

As aves foram vacinadas criteriosamente por dois profissionais treinados, um para cada grupo de aves/tratamento. Visando isolamento dos pintos submetidos a cada grupo vacinal, as aves foram alojadas em boxes ao longo do galpão, sendo 12 parcelas para cada grupo vacinal, localizados em cada lateral do aviário, separados por uma cortina central. Após a vacinação os pintinhos foram alojados nos boxes respectivos ao seu tratamento.

### **3.5 Manejo experimental e variáveis analisadas**

#### **3.5.1 Manejo experimental**

As atividades de manejo em cada lado do galpão foram realizadas por tratadores diferentes, sempre mediante troca de roupas, botas e demais utensílios, visando minimizar contato cruzado dos vírus vacinais pelas aves. Foram utilizados recipientes para aves mortas, exclusivos para cada lado (lateral) do aviário.

A partir do 4<sup>o</sup> dia os bebedouros foram lavados somente em dias alternados com o objetivo de proporcionar maior desafio microbiológico para as aves. A água de bebida para as aves não foi clorada. Os comedouros pendulares eram “virados” duas vezes ao dia para encher os mesmos e estimular o consumo, prática convencional em aviários comerciais de criação de frango de corte. A primeira atividade dentro do aviário foi de observação de

condição ambiental, temperatura e umidade, registro destas variáveis (mínima e máxima) correção se necessário através do manejo de cortina, recolhimento das aves mortas, e registro em ficha de controle zootécnico.

### **3.5.2 Variáveis analisadas**

#### *3.5.2.1 Desempenho*

As pesagens para avaliação de desempenho zootécnico foi realizada no início do período experimental (um dia de vida), com 10 dias de idade e no final do experimento (21 dias).

A ração ofertada e as sobras foram pesadas com 10 e 21 dias para a determinação do consumo de ração e posterior cálculo da conversão alimentar. A mortalidade foi monitorada diariamente e usada para correção no consumo de ração.

#### *3.5.2.2 Biometria*

Aos 7, 14 e 21 dias de idade, as aves foram pesadas, posteriormente uma ave com o peso vivo próximo ao peso vivo médio da unidade experimental (variação máxima de 2%) foi selecionada, eutanasiada por deslocamento cervical, de acordo com a metodologia citada por Pelicano et al. (2003), com posterior necropsia e separação do intestino (delgado e grosso), que foram pesados e mensuradas cada porção (duodeno, jejuno e íleo).

### 3.5.2.3 Morfometria

Para avaliação morfométrica das vilosidades foi separado pequena porção do jejuno após a biometria. As avaliações da morfometria de jejuno foram feitas em uma ave por parcela experimental, no alojamento, com 7, 14 e 21 dias de idade. As amostras de dois centímetros de jejuno foram coletadas e fixadas em formalina 10% (tamponado) e enviadas ao Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Posteriormente foram colocadas em álcool 70% para retirada do fixador, desidratadas em série crescentes de álcoois, impregnadas e incluídas em parafina.

Dos blocos foram obtidos cortes seriados em micrótomo semi-automático ajustado para 5 µm, os cortes obtidos foram colocados em lâmina de vidro, sendo corados pela técnica de Alcian Blue. Para realização das análises histométricas as lâminas foram observadas e fotografadas em um microscópio binocular de luz LEICA ICC50 HD® acoplado a uma câmera digital, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem através do software de captura Leica LAS EZ® (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA).

A análise histométrica se deu através de medições realizadas em imagens digitais obtidas em objetiva de 4x. Foram mensurados de cada animal: 10 leituras da vilosidades e criptas intestinais foram realizadas para altura, largura, distâncias entre as vilosidades e profundidade de cripta de acordo com Alvarenga *et al.* (2004).

A fotomicrografia foi analisada por um programa do software Image J®. A calibração do programa foi realizada utilizando uma fotomicrografia no mesmo aumento (4x) de uma régua micrométrica de 0,01 mm LEICA (50 mm – Referência 10310345), onde 69 pixels corresponderam a 100 micrômetros.

Através das medidas das vilosidades (largura e altura do vilo) e largura da cripta, foi realizado o cálculo da superfície de absorção segundo a metodologia de KISIELINSKI *et al.* (2002), de acordo com a fórmula:

$$\text{Área de Absorção} = \frac{(\text{largura} \times \text{altura}) + \frac{(\text{largura} + \text{altura})^2}{2} - \left(\frac{\text{largura}}{2}\right)^2}{\frac{(\text{largura} + \text{altura})^2}{2}}$$

#### 3.5.2.4 Sorologia

Para avaliação sorológica foram colhidos amostras de sangue de duas aves por boxe (peso vivo próximo à média da unidade experimental  $\pm 2\%$ ). As amostras de sangue foram colhidas por perfuração da veia ulnar cutânea, que cruza o cotovelo, sobre a asa, no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia de vida. Depois de dessorados, foram acondicionados, congelados e enviados para o Laboratório Laudo, laboratório credenciado pelo MAPA para realização de testes oficiais para atendimento ao Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Os soros foram submetidos ao teste de Inibição da Hemaglutinação (HI), prova sorológica quantitativa, qualitativa, sensível e específica, medindo principalmente as imunoglobulinas do tipo IgG contra o antígeno hemaglutinante específico.

A técnica laboratorial de HI é um método conveniente e econômico muito utilizado no controle de outras enfermidades além da doença de Newcastle, como Influenza aviária, micoplasmoses e bronquite infecciosa. O teste de HI é uma prova sorológica quantitativa, qualitativa, sensível e específica medindo principalmente as imunoglobulinas do tipo IgG (BERCHIERI JUNIOR, 2009).

A técnica consiste em titulação de anticorpos em um soro, em que a quantidade de vírus hemaglutinante é constante e a quantidade de soro teste sofre diluições seriadas. Inicialmente é necessário titular a suspensão antigênica para determinar sua atividade hemaglutinante, sendo comum empregar quatro ou oito unidades hemaglutinantes em um teste. Após a mistura da suspensão antigênica ao soro, deixar em repouso durante um intervalo de tempo padrão, a uma temperatura padrão, antes da adição de uma suspensão de hemácias padronizadas. O resultado numérico do teste de HI é a recíproca da mais alta diluição do soro no qual houve completa inibição da hemaglutinação (BERCHIERI JUNIOR *et al.*, 2000).

### **3.6 Análise estatística**

Utilizou-se o pacote estatístico SISVAR para análise dos dados adotando-se a estrutura cruzada entre tratamentos. Para interpretação dos resultados, quando significativa, a interação foi desdobrada. Utilizou-se o teste de F para avaliar diferenças na resposta ao uso das cepas vacinais, assim como para a suplementação dos aditivos. Os resultados originais da HI foram expressos como título geométrico médio (GMT) para DN que foram transformados escala do logaritmo da recíproca do título na base 2. Foi considerado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desempenho e características intestinais da fase pré-inicial

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e de todo o intestino delgado dos frangos de corte aos 7 dias de idade.

Não houve interação ( $P>0,05$ ) entre os fatores estudados (vacina e aditivos na dieta) para o comprimento absoluto e relativo do intestino delgado e dos seus segmentos (duodeno, jejuno e íleo) nos frangos de corte nesta fase pré-inicial.

O tipo de dieta (AMD sem adição de aditivos alternativos ou AMD com adição de aditivos alternativos) não exerceu efeito ( $P>0,05$ ) sobre o comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado das aves aos 7 dias de criação.

Com relação ao comprimento absoluto e comprimento relativo do intestino delgado e de seus segmentos em função do tipo de vacina contra a doença de Newcastle (PHY.LMV.42 e Ulster), foi observado efeito significativo ( $P<0,05$ ) apenas para o comprimento relativo do jejuno e do intestino delgado, sendo que a utilização da cepa vacinal Ulster resultou em maiores comprimentos relativos do jejuno e do intestino. Assim, considerando a ausência de variação significativa para os comprimentos relativos do duodeno e do íleo em função do tipo de vacina, o efeito da vacina Ulster sobre o comprimento relativo do intestino delgado reflete, provavelmente, o maior comprimento relativo do jejuno.

Não existem muitos trabalhos mostrando efeito do tipo de vacina de Newcastle sobre a biometria, morfometria do intestino ou de seus segmentos nos frangos de corte e também o efeito sobre o desempenho zootécnico dos mesmos.

**Tabela 5.** Comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado de frangos de corte, aos sete (7) dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados

Vacina	AMD convencional <sup>1</sup>		AMD + AAEMI <sup>2</sup>		AMD convencional		AMD + AAEMI	
	Comprimento do duodeno (cm)		Média		Comp. relativo do duodeno (cm/kg PV)		Média	
PHY.LMV.42	17,50	17,17	17,33		89,68	84,33	87,00	
Ulster	17,50	17,50	17,50		92,53	88,43	90,48	
Média	17,50	17,33			91,10	86,38		
CV (%) <sup>3</sup>	10,05				9,94			
Vacina	Comprimento do jejuno (cm)		Média		Comp. relativo do jejuno (cm/kg PV)		Média	
PHY.LMV.42	37,92	38,42	38,17		194,16	182,37	188,26b	
Ulster	38,17	39,92	39,04		202,41	201,68	202,04a	
Média	38,04	39,17			198,28	192,03		
CV (%)	6,80				6,19			
Vacina	Comprimento do íleo (cm)		Média		Comp. relativo do íleo (cm/kg PV)		Média	
PHY.LMV.42	36,75	38,16	37,45		188,2	187,6	187,9	
Ulster	39,83	41,25	40,54		210,8	208,0	209,4	
Média	38,29	39,71			199,5	197,8		
CV (%)	14,90				14,37			
Vacina	Comprimento do intestino delgado(cm)		Média		Comp. relativo do intestino delgado (cm/kg PV)		Média	
PHY.LMV.42	92,17	93,75	92,96		472,05	448,40	460,20b	
Ulster	95,50	98,67	97,08		505,71	498,15	501,93a	
Média	93,83	96,21			488,88	479,45		
CV (%)	9,17				8,98			

<sup>1</sup>. dieta sem adição de aditivos alternativos; <sup>2</sup>. dieta com adição de aditivos alternativos; <sup>3</sup>. coeficiente de variação alternativos

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, dentro de um mesma fator, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

Na Tabela 6 são demonstrados os resultados de morfometria intestinal dos frangos de corte aos sete dias de idade e o desempenho zootécnico dos mesmos aos 10 dias de idade.

A análise dos resultados mostrou que não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre os fatores vacina e a suplementação de aditivos na dieta sobre características de desempenho no período de um a dez dias de idade, assim como a morfometria do jejuno aos sete dias de criação.

O tipo de aditivo na dieta influenciou ( $P < 0,05$ ) a altura de vilosidade (AV) e área de absorção (AB) sendo que a dieta AMD + AAEMI proporcionou os maiores valores de AV e AB. O aumento da área de absorção intestinal em resposta a inclusão de aditivos alternativos (*Bacillus subtilis* e butirato de sódio) se deve, provavelmente, ao efeito positivo da dieta AMD + AAEMI sobre a altura de vilosidade.

Em acordo, Viola *et al.* (2008) e Salazar *et al.* (2008) afirmam que ácidos orgânicos (como o ácido butírico e o ácido láctico) podem atuar como agentes tróficos da mucosa intestinal ao estimular o processo mitótico, aumentando o número de enterócitos e o tamanho/altura dos vilos resultando, em consequência, no aumento da área/superfície de absorção intestinal.

Este maior desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos na fase pré-inicial, por estar diretamente relacionado à capacidade de digestão e absorção de nutrientes destinados ao desenvolvimento de órgãos e ao crescimento muscular é, provavelmente, um dos principais fatores que podem justificar o melhor desempenho inicial das aves, efeito benéfico que pode permanecer durante todo o ciclo de produção dos frangos de corte, assim como proposto por Agostinho *et al.* (2012), corroborando com resultados de desempenho verificados na fase pré-inicial no presente estudo.

As características da morfometria intestinal (jejuno), no entanto, não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pelas cepas vacinais PHY.LMV.42 e Ulster durante a fase pré-inicial. Apesar de a cepa Ulster ter promovido maior tamanho relativo do jejuno aos sete dias de idade, o grupo de aves vacinadas com esta cepa não apresentou diferenças nas características de morfometria.

**Tabela 6.** Morfometria intestinal aos sete (7) dias de idade e desempenho dos frangos de corte aos 10 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados

Vacina	AMD convencional		AMD + AAEMI	AMD convencional		AMD + AAEMI
	Altura de vilosidade ( $\mu\text{m}$ )		Média	Área de absorção intestinal		Média
PHY.LMV.42	1118	1288	1203	13	16	15
Ulster	1004	1237	1120	12	16	14
Média	1061B	1263A		13B	16A	
CV (%)	12,40			13,35		
Vacina	Profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ )		Média	Consumo de ração (g)		Média
	PHY.LMV.42	70	77	74	317,0	310,5
Ulster	64	66	65	292,1	300,5	296,3b
Média	67	71		304,7	305,5	
CV (%)	21,70			2,36		
Vacina	Distância entre vilosidades ( $\mu\text{m}$ )		Média	Ganho de peso (g/ave)		Média
	PHY.LMV.42	69	62	65	286	294
Ulster	64	54	59	273	283	278b
Média	66	58		279B	288A	
CV (%)	14,44			2,80		
Vacina	Largura das vilosidades ( $\mu\text{m}$ )		Média	Conversão alimentar		Média
	PHY.LMV.42	185	181	183	1,112	1,056
Ulster	208	200	204	1,072	1,063	1,068
Média	196	190		1,092A	1,060B	
CV (%)	14,49			3,27		

Dieta AMD convencional: dieta sem adição de aditivos alternativos; Dieta AMD + AAEMI: dieta com adição de aditivos alternativos; CV(%): coeficiente de variação; Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, dentro de um mesmo fator, diferem entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

O consumo de ração (CR) durante a fase pré-inicial de criação dos frangos, não foi influenciado ( $P > 0,05$ ) pela inclusão de probiótico + ácido orgânico (dieta AMD + AAEMI), indicando que os níveis de adição de *Bacillus subtilis* e butirato de sódio protegido utilizado não foram suficientes para afetar o consumo voluntário das aves.

Resultados semelhantes foram observados por Boratto *et al.* (2004) que relataram a falta de variação significativa para o consumo de ração de frangos de corte, durante a fase pré-inicial, em função do tipo de dieta (isenta de aditivos promotores de crescimento, com inclusão de antibióticos ou com adição de probióticos).

De forma similar, Paz *et al.* (2010) não verificaram diferenças no consumo de alimento por frangos de corte, durante o período de um a dez dias, recebendo rações com inclusão de antibiótico (avilamicina + sulfato de colistina), ou prebióticos, prebióticos + ácidos orgânicos ou adição somente de probiótico (*Bacillus subtilis*).

O uso de aditivos alternativos (dieta AMD + AAEMI) influenciou ( $P < 0,05$ ) positivamente o ganho de peso (GP) dos frangos de corte durante a fase pré-inicial. Concordando com os resultados obtidos, Flemming e Freitas (2005) relataram maior ganho de peso, ao final do período de um a sete dias, em frangos de corte alimentados com ração contendo inclusão de probiótico (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) em comparação as aves que receberam rações sem a inclusão de aditivos ou com adição apenas de antibiótico.

Considerando o padrão de resposta para CR dos frangos em função do tipo da dieta observados no presente estudo, associado o fato de que as rações experimentais foram formuladas para serem isonutritivas, pode-se inferir que o maior ganho de peso proporcionado pela dieta AMD + AAEMI foi devido a uma melhora na utilização dos nutrientes da ração, estando coerente com os resultados encontrados para altura de vilosidades e da área de absorção intestinal.

No entanto, Faria *et al.* (2009) relataram a falta de variação significativa para o ganho de peso de frangos em resposta a inclusão de ácidos orgânicos na ração aos sete dias de idade das aves. Da mesma forma, Paz *et al.* (2010) não

observaram variação no GP de frangos de corte, na fase de 1 a 10 dias, para as aves que receberam rações com antibiótico, inclusão de probiótico (*Bacillus subtilis*) ou sem a adição de aditivos.

A conversão alimentar (CA) das aves também foi influenciada ( $P < 0,05$ ) pelo tipo de dieta sendo que a melhor CA foi observada nos frangos alimentados com a dieta AMD + AAEMI, devido, provavelmente, ao aumento na área de absorção intestinal e, conseqüentemente, melhora na eficiência de utilização dos nutrientes em resposta a adição de probiótico + ácido orgânico na ração, como foi proposto anteriormente.

Em acordo, Leeson *et al.* (2005) afirmaram que o ácido butírico pode agir sobre a estrutura da mucosa intestinal aumentando a sua área de assimilação, o que resultaria em melhor eficiência de utilização dos nutrientes da dieta (digestão e absorção), justificando o efeito da inclusão do ácido butírico na ração em melhorar a conversão alimentar e promover maior taxa de crescimento dos frangos de corte.

Segundo Freitas *et al.* (2007), a maior altura das vilosidades está relacionada aos resultados de desempenho, em que as aves apresentam maior ganho de peso e melhor conversão alimentar, fato este relacionado com a integridade da mucosa intestinal e processo metabólico, que confere a característica de quanto maior o tamanho dos vilos, maior é a capacidade de digestão e absorção de nutrientes, em função da maior área de contato e efetividade enzimática no nível de mucosa e lúmen intestinal.

O tipo de vacina utilizado exerceu efeito ( $P < 0,05$ ) sobre o CR e o GP, sendo que a vacina PHY.LMV.42 resultou em maior consumo e maior ganho de peso pelos frangos de corte. Considerando que as rações experimentais foram isonutritivas, a maior taxa de crescimento observada para os frangos que receberam a cepa vacinal PHY.LMV.42 reflete, provavelmente, o maior consumo de alimento e, conseqüentemente, a maior ingestão de nutrientes, o que possibilitou maior GP. Em concordância, Mendonça *et al.* (2008), afirmaram que o crescimento de frangos de corte depende da ingestão de nutrientes, portanto, o maior CR pode ter proporcionado maior crescimento das aves.

O maior tamanho relativo do jejuno das aves vacinadas com cepa Ulster aos 7 dias de idade não refletiu em maior ganho de peso ou maior consumo de ração constatado nas aves vacinadas com a cepa PHY.LMV.42. Esta observação nos remete a inferir que no presente estudo o maior tamanho relativo do intestino delgado não proporcionou maior ganho de peso e que o efeito do tipo de vacina sobre o desempenho zootécnico da ave não foi tão relevante. Salienta-se porém que maior ganho de peso ou peso observado em aves vacinadas com PHY.LMV.42 (provavelmente em função do maior consumo de ração) pode ter sido responsável pelo menor tamanho relativo do jejuno e do intestino delgado nesse grupo de aves.

Não foi constatada diferença significativa ( $P>0,05$ ) para CA dos frangos de corte em função do tipo de vacina utilizado (PHY.LMV.42 e Ulster), o que permite inferir que provavelmente o tipo de cepa vacinal não modificou a eficiência de utilização dos nutrientes da ração. Da mesma forma, o maior tamanho relativo do jejuno e do intestino delgado no grupo de aves vacinadas com a cepa Ulster não promoveu maior eficiência alimentar.

A fase pré-inicial por se tratar daquela de maior crescimento relativo e desenvolvimento do intestino delgado é de extrema importância para produção avícola. Da mesma forma, considera-se a fase pré-inicial àquela de maior variação nas respostas de desempenho em função dos valores observados normalmente. Assim efeitos dos tipos de cepas vacinais avaliadas e a sua relação com o uso de aditivos alimentares é relevante e a realização de novos trabalhos nesta área poderão contribuir de sobremaneira na elucidação de possíveis efeitos pós-vacinais de cepas enterotrópicas para doença de Newcastle que impactem no desenvolvimento intestinal e por consequência sobre desempenho de pintos de corte em crescimento.

## 4.2 Desempenho e características intestinais da fase inicial

Os resultados de biometria (comprimento absoluto e relativo do intestino e seus segmentos) dos frangos de corte aos 14 dias de idade estão representados na Tabela 7.

Não foi observada interação significativa ( $P>0,05$ ) entre os fatores estudados (vacina e tipos de aditivos na dieta) para as características de biometria estudadas em frangos de corte nessa idade.

Considerando os fatores isoladamente, os comprimentos absolutos e relativos do intestino delgado (e segmentos) não variaram de forma significativa ( $P>0,05$ ) em resposta aos tipos de aditivos na dieta e ao tipo de cepa vacinal avaliados na segunda semana de vida das aves.

Resultados similares foram relatados por Alva (2014) que não constatou variação no comprimento absoluto do duodeno, jejuno e íleo do intestino de frangos de corte, aos 14 dias de idade, alimentados com rações sem inclusão de aditivos promotores de crescimento, com adição apenas de antibiótico (lincomicina) ou com adição de probiótico (*Bacillus subtilis*).

**Tabela 7.** Comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado de frangos de corte, aos 14 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados

Vacina	AMD convencional		AMD + AAEMI	AMD convencional		AMD + AAEMI
	Comprimento do duodeno (cm)		Média	Comp. relativo do duodeno (cm/kg PV)		Média
PHY.LMV.42	19,83	20,00	19,92	37,47	37,29	37,38
Ulster	19,50	20,17	19,83	38,17	38,25	38,21
Média	19,67	20,08		37,82	37,77	
CV (%)	9,08			8,44		
Vacina	AMD convencional		AMD + AAEMI	AMD convencional		AMD + AAEMI
	Comprimento do jejuno (cm)		Média	Comp. relativo do jejuno (cm/kg PV)		Média
PHY.LMV.42	50,08	48,92	49,50	94,61	91,14	92,87
Ulster	46,58	49,68	48,13	91,16	94,18	92,67
Média	48,33	49,30		92,88	92,66	
CV (%)	10,88			9,98		
Vacina	AMD convencional		AMD + AAEMI	AMD convencional		AMD + AAEMI
	Comprimento do íleo (cm)		Média	Comp. relativo do íleo (cm/kg PV)		Média
PHY.LMV.42	50,50	48,75	49,63	95,35	90,88	93,11
Ulster	45,33	50,00	47,67	88,99	94,72	91,85
Média	47,92	49,38		92,17	92,80	
CV (%)	11,85			11,55		
Vacina	AMD convencional		AMD + AAEMI	AMD convencional		AMD + AAEMI
	Comprimento do intestino delgado(cm)		Média	Comp. relativo do intestino delgado (cm/kg PV)		Média
PHY.LMV.42	120,42	117,67	119,04	227,43	219,30	223,36
Ulster	111,42	119,85	115,63	218,31	227,15	222,73
Média	115,92	118,76		222,87	223,22	
CV (%)	8,91			8,19		

Dieta AMD convencional: dieta sem adição de aditivos alternativos; Dieta AMD + AAEMI: dieta com adição de aditivos alternativos; CV(%): coeficiente de variação; Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, dentro de um mesma fator, diferem entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Na Tabela 8 estão representados os resultados de morfometria do jejuno das aves aos 14 dias. Não foi observada interação significativa entre os fatores ( $P>0,05$ ) para as características de morfometria intestinal (jejuno) dos frangos aos 14 dias de idade exceto para a altura de vilosidades ( $P<0,05$ ).

**Tabela 8.** Morfometria intestinal de frangos de corte aos 14 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados

Vacina	AMD convencional	AMD + AAEMI	Média
	Altura de vilosidade ( $\mu\text{m}$ )		
PHY.LMV.42	1506 aB	1719 aA	1625 a
Ulster	1532 aA	1420 bA	1463 b
Média	1519	1570	
CV (%)	7,33		
Profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ )			Média
PHY.LMV.42	50	50	50
Ulster	51	51	51
Média	50,5	50,5	
CV (%)	15,21		
Distância entre vilosidades ( $\mu\text{m}$ )			Média
PHY.LMV.42	85	86	86
Ulster	80	83	81
Média	82,5	84,5	
CV (%)	18,47		
Largura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )			Média
PHY.LMV.42	197	196	196,5
Ulster	203	195	199,0
Média	200,0	195,5	
CV (%)	13,71		
Área de absorção			Média
PHY.LMV.42	16	18	17
Ulster	16	15	16
Média	16,0	16,5	
CV (%)	14,45		

Dieta AMD convencional: dieta sem adição de aditivos alternativos; Dieta AMD + AAEMI: dieta com adição de aditivos alternativos; CV(%): coeficiente de variação;

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, dentro de um mesmo fator, diferem entre si pelo teste F ( $P<0,05$ ).

Considerando o fator dieta dentro do fator vacina e vice versa foi observada variação significativa ( $P<0,05$ ) apenas quando foi utilizada a vacina com cepa PHY.LMV.42 e a dieta contendo aditivo (AMD + AAEMI).

Com base nos valores de interação observados para a variável altura de vilosidade pode-se inferir que a utilização de aditivos alternativos equilibradores de microbiota (*Bacillus subtilis* e butirato de sódio protegido) em rações contendo antibiótico em dosagem subterapêutica (AMD) associado à vacina PHY.LMV.42 proporcionou maior altura das vilosidades. Este efeito trófico não

foi observado quando se utilizou a vacina Ulster, independente do tipo de dieta (AMD ou AMD + AAEMI) e nas dietas sem inclusão de aditivos alternativos independente da cepa vacinal (PHY.LMV.42 ou Ulster).

Tais resultados sugerem a necessidade de mais pesquisas avaliando-se a morfometria intestinal visando estabelecer as causas que impactaram em uma ausência de resposta com o uso de aditivos na dieta (AMD + AAEMI) do grupo de aves vacinadas com cepa ULSTER.

Nenhuma das outras características de morfometria intestinal estudadas como profundidade de cripta, distância entre vilosidades, largura da vilosidade e área de absorção das aves ao final dos 14 dias foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pela dieta ou tipo de vacina.

Estão representados os resultados de comprimento absoluto e relativo do intestino e dos seus segmentos dos frangos de corte aos 21 dias de idade na Tabela 9.

Não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre os fatores estudados (vacina e tipos de aditivos nas dietas) para nenhuma das variáveis de biometria intestinal avaliadas (comprimento absoluto e relativo) nessa idade.

**Tabela 9.** Comprimento absoluto e relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado de frangos de corte, aos 21 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados

Vacina	AMD convencional			AMD + AAEMI		
	Comprimento do duodeno (cm)	Média	CV (%)	Comp. relativo do duodeno (cm/kg PV)	Média	CV (%)
PHY.LMV.42	21,00	22,50	9,70	20,83	22,31	10,28
Ulster	22,33	22,83		22,56	22,94	
Média	21,67B	22,83		21,70	22,94	
CV (%)	9,70			10,28		
Vacina	AMD convencional			AMD + AAEMI		
	Comprimento do jejuno (cm)	Média	CV (%)	Comp. relativo do jejuno (cm/kg PV)	Média	CV (%)
PHY.LMV.42	52,50	55,46	10,08	52,08	54,97	10,22
Ulster	56,17	56,00		56,76	56,26	
Média	54,33	56,00		54,42	56,82	
CV (%)	10,08			10,22		
Vacina	AMD convencional			AMD + AAEMI		
	Comprimento do íleo (cm)	Média	CV (%)	Comp. relativo do íleo (cm/kg PV)	Média	CV (%)
PHY.LMV.42	51,92	53,71	10,56	51,46	53,22	10,79
Ulster	57,08	56,46		57,68	56,75	
Média	54,50	56,46		54,57	55,40	
CV (%)	10,56			10,79		
Vacina	AMD convencional			AMD + AAEMI		
	Comprimento do intestino delgado (cm)	Média	CV (%)	Comp. relativo do intestino delgado (cm/kg PV)	Média	CV (%)
PHY.LMV.42	125,42	131,67	8,52	124,37	130,51	8,80
Ulster	135,58	135,29		137,00	135,96	
Média	130,50	136,46		130,69	135,78	
CV (%)	8,52			8,80		

Dieta AMD convencional: dieta sem adição de aditivos alternativos; Dieta AMD + AAEMI: dieta com adição de aditivos alternativos; CV(%): coeficiente de variação;

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, dentro de um mesma fator, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

O tipo de aditivos suplementares nas dietas influenciou ( $P < 0,05$ ) o comprimento do duodeno dos frangos de corte ao final do período de 1 a 21 dias, sendo que a dieta com aditivos alternativos equilibradores de microbiota intestinal resultou em maior comprimento do duodeno, o que difere do resultado encontrado por Alva *et al.* (2012) que não verificaram efeito do tipo de aditivo adicionado à ração dos frangos até os 28 dias de idade.

Corrêia *et al.* (2000) encontraram efeito de dieta contendo aditivo alternativo *Bacillus subtilis*, na fase inicial de 1 a 21 dias promovendo menor consumo e melhor conversão alimentar.

Os resultados nesta fase (idade) corroboram com achados de Machinsky (2008) o qual, relata que os ácidos orgânicos, usados como aditivo alternativo, tem efeitos tróficos sobre a mucosa do trato gastrointestinal sendo usados como fonte energética preferencial para as células intestinais e age também sobre o crescimento e integridade da mucosa, atuando positivamente sobre a atividade microbiana luminal. No mesmo sentido, Barreto (2007) destaca a importância de se manter a integridade do trato gastrointestinal das aves no início da criação para permanecer saudável e funcional por toda a vida, uma vez que refletirá diretamente na produtividade desses animais.

O comprimento absoluto do jejuno, íleo e intestino delgado das aves aos 21 dias de idade não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pela dieta contendo aditivo alternativo equilibrador da microbiota intestinal. Da mesma forma que os resultados obtidos por Alva *et al.* (2012) nos quais também não se observou efeitos da inclusão de aditivos (lincomicina, *Bacillus subtilis* e ácido cítrico) sobre o comprimento do jejuno e íleo de frangos de corte ao final do período de 1 a 28 dias de idade.

Os diferentes tipos de cepas vacinais não exerceram efeito ( $P > 0,05$ ) sobre o comprimento do intestino delgado e dos seus segmentos.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados de morfometria intestinal e desempenho zootécnico aos 21 dias de idade do frango de corte.

Não houve interação significativa entre os fatores ( $P > 0,05$ ) para as características de morfometria intestinal dos frangos de corte neste período exceto para a largura de vilosidades ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 10.** Morfometria intestinal e desempenho dos frangos de corte aos 21 dias de idade, em função da dieta, do tipo de vacina e a interação entre os fatores estudados

Vacina	AMD convencional		AMD + AAEMI	AMD convencional		AMD + AAEMI
		Altura de vilosidade ( $\mu\text{m}$ )		Média	Área de absorção intestinal	
PHY.LMV.42	1421	1583	1502	14,79	17,31	16,05
Ulster	1331	1547	1439	14,69	15,44	15,07
Média	1376B	1565A		14,74B	16,38A	
CV (%)	12,28			10,14		
Vacina	Profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ )		Média	Consumo de ração (g)		Média
PHY.LMV.42	53	56	54	1323	1331	1327a
Ulster	69	59	64	1295	1323	1309b
Média	61	58		1309B	1327A	
CV (%)	30,46			1,45		
Vacina	Distância entre vilosidades ( $\mu\text{m}$ )		Média	Ganho de peso (g/ave)		Média
PHY.LMV.42	82	79	80	935	950	942,5
Ulster	82	87	84	925	947	936,0
Média	82	83		930B	948A	
CV (%)	11,88			1,55		
Vacina	Largura das vilosidades ( $\mu\text{m}$ )		Média	Conversão alimentar		Média
PHY.LMV.42	203aA	184aA	193,5	1,416	1,401	1,408
Ulster	173bB	205aA	189,0	1,400	1,398	1,399
Média	188	194,5		1,408	1,399	
CV (%)	10,87			1,48		

Dieta AMD convencional: dieta sem adição de aditivos alternativos; Dieta AMD + AAEMI: dieta com adição de aditivos alternativos; CV(%): coeficiente de variação; Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, dentro de um mesmo fator, diferem entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

A altura de vilosidade e área de absorção foram influenciadas ( $P < 0,05$ ) pelos tipos de aditivos usados na dieta de forma que houve crescimento das vilosidades da mucosa intestinal e da área de absorção em resposta a inclusão de aditivos alternativos nas rações.

Os resultados corroboram com proposições de Smith *et al.* (2008) que sugerem que o butirato (ácido butírico) é um importante ácido graxo de cadeia curta que é usado em nível intestinal como nutriente para manter a integridade do epitélio do trato gastrointestinal, apresentando diversos efeitos benéficos sobre a mucosa intestinal, ajudando na maturação e proliferação dos enterócitos, e assim promovendo maior altura de vilosidade e área de absorção.

No entanto, Ramos *et al.* (2011) relataram que os diferentes melhoradores de crescimento (antibióticos, prebiótico, probiótico, prebiótico + probiótico) não interferem sobre a altura da vilosidade do jejuno de frangos de corte ao final do período de 1 a 21 dias de idade.

Pelicano *et al.* (2005) encontraram valores médios de altura de vilosidade do jejuno (1.243  $\mu\text{m}$ ), em frangos com 21 dias de idade, usando uma dieta contendo somente *Bacillus subtilis*, enquanto que os valores mínimo e máximo encontrados no presente trabalho variaram de 1.546 a 1.582 e 1.331 a 1.421, respectivamente para as dietas com e sem inclusão de aditivos alternativos. Diante destes resultados pode-se inferir que o uso combinado do próbiótico (*Bacillus subtilis*) e do butirato de sódio (ácido orgânico) tiveram um efeito sinérgico na mucosa intestinal propiciando uma melhor condição de crescimento dos vilos.

Os tipos de aditivos nas dietas não influenciaram ( $P > 0,05$ ) a profundidade de cripta e a distância entre vilosidades da mucosa intestinal das aves ao final do período de 1 a 21 dias. Os resultados estão de acordo com Pelicano *et al.* (2003) que constataram que não houve diferença significativa entre as dietas com inclusão de probióticos e uma dieta controle, para os parâmetros profundidade de cripta do duodeno, jejuno e íleo.

As cepas vacinais não exerceram efeito ( $P > 0,05$ ) sobre a altura de vilosidade, profundidade de cripta, distância entre vilosidades e área de absorção.

Analisando a interação entre dieta e vacina para a largura de vilosidade foi observada variação significativa ( $P < 0,05$ ), ao considerar o fator tipo de aditivo na dieta dentro do fator vacina, verificou-se que no grupo vacinado com a cepa Ulster, houve maior largura das vilosidades para aves submetidas a dieta AMD + AAEMI em contrapartida à aves apenas com AMD nas rações. Por outro lado houve diferenças na largura das vilosidades entre o grupo PHY.LMV.42 e Ulster, como maiores valores para PHY.LMV.42 quando a ração continha apenas AMD convencional.

Normalmente a largura das vilosidades tem efeito inversamente proporcional à área de absorção, conforme sugerido por Kasilienski (2002). Os resultados do presente estudo demonstram que as cepas vacinais utilizadas geram modificações no padrão de desenvolvimento da morfometria do jejuno (segmento do intestino avaliado). Por outro lado, outros autores como Sakamoto *et al*, (2000) sugerem relação diretamente proporcional entre altura e largura de vilosidades sobre a superfície de absorção e assim sendo a largura maior, potencializa a superfície de absorção intestinal.

De acordo com os resultados, aves vacinadas com PHY.LMV.42 não sofreram alterações na largura das vilosidades do jejuno quando foram alimentadas com dieta AMD + AAEMI, enquanto o grupo de aves submetidas à vacinação com a cepa Ulster e alimentadas com dietas contendo AMD e AAEMI apresentavam vilosidades com maior largura em detrimento àquelas apenas com AMD nas rações. Nessa situação, curiosamente, os aditivos alternativos não propiciaram melhoria nas características da morfometria intestinal para este grupo de aves, um contraponto para os resultados encontrados até então.

Ressalta-se novamente, que diferentes metodologias são usadas para determinar superfície de absorção intestinal, sendo que há aquelas que apontam efeitos negativos da largura sobre a superfície de absorção e outras que a relacionam diretamente com a área de absorção juntamente com a altura das vilosidades.

Não foi constatada interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre os fatores tipos de aditivos nas dietas e cepas vacinais para as variáveis de desempenho dos frangos de corte avaliadas ao final do período de 1 a 21 dias de idade.

As características de desempenho zootécnico; consumo de ração (CR) e ganho de peso (GP) dos frangos de corte variaram de forma significativa ( $P < 0,05$ ) em função do tipo de aditivo usado nas dietas para alimentação das aves, com os maiores valores de CR e GP observados para os frangos que receberam as rações com inclusão de aditivos alternativos equilibradores de microbiota intestinal em conjunto com antibiótico em dosagem subterapêutica (AMD + AAEMI). Assim como sugerido anteriormente, o maior crescimento dos frangos alimentados com as dietas contendo inclusão de aditivos alternativos (*Bacillus subtilis* e butirato de sódio) se deve ao maior consumo de alimento e, conseqüentemente, na maior ingestão de energia e nutrientes.

Analizando-se o CR os autores Loddi *et al.* (2000), Salazar *et al.* (2008) e Paz *et al.* (2010) constataram efeito da inclusão de probióticos ou de ácidos orgânicos sobre o consumo voluntário por frangos de corte durante as três primeiras semanas de criação das aves, de forma similar aos resultados encontrados no presente trabalho.

No entanto, Nunes (2008) avaliando rações com inclusão de promotor de crescimento (avilamicina) ou aditivos alternativos (prébiótico ou probiótico), relatou a ausência de variação significativa para o consumo de ração de frangos de corte nas três primeiras semanas de idade das aves. Panda *et al.* (2009) e Meurer *et al.* (2010) também não observaram efeito para o CR por frangos, durante o período de 1 a 21 dias de idade, recebendo rações com diferentes níveis de inclusão de ácido orgânico (ácido butírico) em comparação com as rações sem inclusão de aditivos ou com adição apenas de antibiótico como promotor de crescimento.

O padrão de comportamento para ganho de peso em função dos aditivos usados na dieta, obtido neste estudo são semelhante aos resultados encontrados por Salazar *et al.* (2008), que observaram maior crescimento corporal em frangos, ao final do período inicial (1 a 21 dias de idade), para as aves alimentadas com ração contendo inclusão de ácido orgânico (ácido butírico) em relação ao proporcionado pelas rações com adição apenas de antibiótico (avilamicina) como promotor de crescimento.

Resultado diferente foi verificado por Ramos *et al.* (2011) que não verificaram efeito de diferentes aditivos (antibiótico; probiótico; prébiótico; probiótico + prébiótico) sobre o ganho de peso de frangos de corte submetidos

a desafio sanitário (mistura de cama nova com cama reutilizada), durante o período de 1 a 21 dias de idade.

Não houve efeito do tipo de aditivo nas dietas sobre a conversão alimentar dos frangos de corte. Da mesma forma, Salazar *et al.* (2008) não relataram variação significativa na conversão alimentar de frangos, aos 21 dias de idade, ao comparar as aves alimentadas com rações contendo ou não inclusão de ácido orgânico (ácido lático ou butírico).

Em acordo, Lima *et al.* (2003) não constataram efeito significativo da inclusão de diferentes níveis de probióticos (0, 200 e 400 ppm de *Bacillus subtilis*) sobre o CR, GP, e CA de frangos de corte aos 42 dias de idade. Da mesma forma, Nunes (2008) não observou o efeito da inclusão de aditivos (antibiótico; prébiótico e probiótico) na ração sobre a CA de frangos de corte ao final do período de 1 a 21 dias de idade.

Porém, divergindo dos resultados encontrados, Silva (2000) observaram melhora na conversão alimentar de frangos de corte, durante o período de 1 a 21 dias, em resposta a inclusão de probiótico na dieta das aves, inferindo que a adição de aditivos pode melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes da ração.

Os diferentes resultados obtidos nos trabalhos podem estar relacionados, entre outros fatores, a variações nos níveis de inclusão dos probióticos ou dos ácidos orgânicos, utilização de diferentes ácidos orgânicos com proporções variáveis nas rações, probióticos com diferentes composições de microrganismos e até mesmo cepas diferentes dentro de um mesmo produto, diferenças nos níveis nutricionais das rações experimentais, variação nas condições de desafio microbiológico e higiene na criação das aves, linhagem, sexo, densidade de criação e diferentes ambientes térmicos aos quais os frangos de corte foram submetidos durante o período experimental, assim como proposto por Viola *et al.* (2008), Faria *et al.* (2009) e Ramos *et al.* (2011).

O consumo de ração (CR) das aves de 1 a 21 dias de idade foi influenciado ( $P < 0,05$ ) pelo tipo de cepa vacinal, no qual as aves vacinadas com a cepa PHY.LMV.42 tiveram maior consumo de ração em comparação com o grupo imunizado com cepa Ulster. No entanto, o GP e CA não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pelo tipo de vacina administrada às aves.

As respostas obtidas na fase pré-inicial provavelmente foram diluídas na fase inicial no que tange aos efeitos da vacina e como já mencionado, o eventual efeito subclínico da infecção causada pela replicação do vírus vacinal em nível intestinal pode não ter sido suficiente para detecção de respostas de desempenho mais evidentes.

Cabe ressaltar a dificuldade em comparar resultados em função das diferentes cepas vacinais enterotrópicas apatogênicas em virtude da ausência de trabalhos (pesquisados) comparando cepas com tais características. Como demonstrado na revisão, a comparação de cepas lentogênicas respiratórias são mais comuns na literatura, enquanto que cepas enterotrópicas foram desenvolvidas em período relativamente mais recente. Da mesma forma, a comparação de diferentes cepas normalmente exige isolamento de instalações dificultando ainda mais pesquisas em mesmas condições de ambiente o instalações com aplicabilidade prática.

### 4.3 Sorologia

Para os fatores estudados (vacina e tipos de aditivos na dieta) não houve interação ( $P > 0,05$ ) através da prova sorológica de inibição da hemaglutinação (HI) para a doença de Newcastle avaliadas nas idades de 7, 14 e 21 dias como pode ser visto na Tabela 11.

Os títulos médios geométricos (GMT) em HI foram mais altos com 7 dias, diminuindo durante os 21 dias de experimento. Rauw *et al.* (2010) e Murarolli (2008) verificaram que estes GMTs para Newcastle dos frangos de corte até duas ou três semanas de vida são, provavelmente, de origem de transferência de imunidade passiva pela matriz.

Rauw *et al.* (2009) e Bennejean *et al.* (1978) afirmam que os anticorpos transferidos por imunidade materna, transmitidos através da gema, podem interferir com o desenvolvimento de uma imunidade ativa, promovida pela vacina, com anticorpos circulantes. Segundo Zakay-Rones e Levy (1973) estes anticorpos maternos não interferem com a proteção local de mucosas. Em um estudo conduzido por Russell e Kock (1993) comprova que a imunidade local

promovida pela vacina, através dos títulos médios de IgA, 10 dias após a vacinação ocular no primeiro dia de vida, nos líquidos corporais; bile, lágrimas e soro.

**Tabela 11.** Títulos de GMT em HI para Newcastle em função da dieta e tipo de vacina dos frangos de corte aos 7, 14 e 21 dias de idade

Vacina	AMD convencional	AMD + AAEMI	Média
HI 7 dias (GMT)			
PHY.LMV.42	5,666	6,333	6,000
Ulster	5,333	5,500	5,416
Média	5,500	5,916	
CV (%)		20,73	
HI 14 dias (GMT)			
PHY.LMV.42	3,583	3,500	3,541
Ulster	2,750	3,416	3,083
Média	3,166	3,458	
CV (%)		39,53	
HI 21 dias (GMT)			
PHY.LMV.42	1,750	1,833	1,791
Ulster	2,333	3,166	2,750
Média	2,041	2,500	
CV (%)		78,39	

Dados acima são os resultados originais dos títulos em HI transformados em logaritmo na base 2; Diluições na base de log 2; 1/4(2,0), 1/8 (3,0), 1/16 (4,0), 1/32 (5,0), 1/64 (6,0) 1/128 (7,0), 1/256 (8,0) e 1/512 (9,0);

Valores de referência: X = 0, negativo, ausência de anticorpos / X = 2 a 8, suspeito de aves com infecção ou baixa resposta a vacina / X = 16 a 64, após vacina viva / X = 256 a 4096, após vacina inativada;

Valor médio em HI dos pintinhos no primeiro dia de idade foi 8,4 (base de log 2)

GMT – Títulos médios geométricos

A soroconversão de aves SPF vacinadas no primeiro dia de vida tem comportamento diferente do presente trabalho demonstrada pelo estudo do Perozo *et al.* (2008) no qual as aves soroconverteram somente a partir de 11 a 15 dias após a vacina feita no primeiro dia de vida. No presente estudo as aves experimentais não eram SPF e, portanto as aves herdavam anticorpos maternos e as respostas sorológicas se comportaram de forma contrária, com queda de títulos maternos, por provável inativação parcial destes anticorpos. Estes estudos corroboram para o entendimento da queda de título encontrada no presente trabalho do alojamento até 21 dias de idade.

Em regiões onde o vírus de Newcastle patogênico (mesogênico ou velogênico) ou vírus vacinal de campo (lentogênico) estão mais prevalentes os títulos de GMT em HI são maiores, portanto pode-se inferir que as aves do presente experimento não estavam em regiões de alto desafio, pois os títulos

não aumentaram com avanço da idade da ave. Segundo Chrysostome *et al.* (1995) as estirpes dos vírus da doença de Newcastle velogênicas normalmente apresentam maior taxa de soroconversão ativa quando comparadas às estirpes de VDN lentogênicas, sendo esses iguais ou superiores a  $\log_2 10$ . No presente estudo os títulos de GMT das aves aos 21 dias de idade não passaram de  $\log_2 3$ , inferindo se tratar de região de baixo desafio sanitário da doença de Newcastle, do qual Murarolli (2008) após obterem baixos resultados de títulos de anticorpos, soroconversão, também propuseram a mesma conclusão diante da região que realizaram o trabalho.

Pelo número de aves usadas no presente estudo ser reduzido, todas as aves vieram da mesma origem de matriz, o que explica provavelmente o baixo coeficiente de variação (20,73%) do GMT da sorologia em HI das aves com sete dias de idade, devido a uma provável transferência de anticorpos para a progênie, mais uniforme.

A imunização ainda no incubatório com vacina viva contra a doença de Newcastle promoveria proteção local precoce das aves e teria a segurança e garantia do processo de vacinação e uma melhor eficiência na cobertura vacinal para a maioria dos pintinhos, promovida pela administração da vacina nas plantas dos incubatórios. Esta é uma estratégia comum estabelecida por técnicos especialistas em biossegurança visando minimizar eventuais desafios de campo, principalmente em virtude da falta de controle da penetração de cepas patogênicas do vírus de Newcastle nas frotas das granjas, das cidades, das regiões e do país.



## 5 CONCLUSÃO

De forma explícita, o uso de aditivos alternativos equilibradores da microbiota intestinal em conjunto com o aditivo melhorador de desempenho convencional, melhoram características de desenvolvimento intestinal, independente do tipo de vacina utilizada e esse fato implica em melhor desempenho de frangos de corte na fase inicial de criação.

Há uma importante relação entre o uso de cepas vacinais enterotrópicas contra DNC e a suplementação de aditivos que atuam e têm funcionalidades sobre a saúde intestinal e tais fatos foram evidenciados nas respostas observadas sobre morfometria intestinal aos 14 e 21 dias de idade das aves, mas que também guardam correlação com resultados de comprimento absoluto e relativo do jejuno aos 7 dias assim como o desempenho das aves aos 10 dias de criação.

As diferentes cepas vacinais enterotrópicas contra DNC avaliadas, em algum grau geram impacto diferenciado sobre o desenvolvimento intestinal e demandam estudos mais aprofundados para investigar a magnitude das respostas.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. 1999. Poultry and dietary acids. **Feed International** 19: 1370-1372.
- AGOSTINHO, T.S.P.; CALIXTO, L.F.L.; GOMES, A.V.C.; TOGASHI, C.K.; CURVELLO, F.A.; LIMA, M.F. 2012. Desenvolvimento de órgãos do trato gastrintestinal e desempenho de frangos de corte arraçoados na fase pré-alojamento. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal** 13: 1143-1155.
- ALBINO, L.F.T.; TAVERNARI, F.C. 2008. **Produção e manejo de frangos de corte**. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- ALEXANDER D.J.; JONES, R.C. 2003. **Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections**. p. 63-87. In: SAIF, Y.M., ed. Diseases of poultry. Iowa State University Press, Ames, Iowa, Estados Unidos.
- ALEXANDER, D.J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. **Journal Comparative Pathology** 122: 105-106.
- AL-GARIB, S.O.; GIELKENS, A.L.J; GRUYS, E.; KOCH, G. 2003. Review of Newcastle disease vírus with particular references to immunity and vaccination. **World's Poultry Science Journal** 59: 185-200.
- ALVA, J.C.R. 2014. **Aditivos na alimentação de frangos de corte: desempenho, características morfológicas e funcionais**. Tese (Zootecnia). UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- ALVA, J.C.R.; MARQUES, R.H.; BORGES, L.L. 2012. **Avaliação morfológica de intestino, fígado e pâncreas em frangos de corte submetidos a diferentes dietas com aditivos nutricionais alternativos aos promotores de crescimento**. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia). UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- ALVARENGA, B.O.; BELETTI, M.E.; FERNANDES, E.A.; SILVA, M.M.; CAMPOS, L.F.B; RAMOS, S.P. 2004. Efeitos de fontes alternativas de fósforo nas rações de engorda e abate sobre a morfologia intestinal de frangos de corte. **Bioscience Journal** 20: 55-59.
- ARAÚJO, J.A.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L.; LIMA, M.R.; LIMA, C.B. 2007. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasília** 1: 69-77.
- ARNS, C.W.; SPILKI, F.R. ; ALMEIDA, R.S. ; SANTOS, M.M.A.B. **Familia Paramyxoviridae**. 2012. p. 761-793. In: FLORES, E.F, org. Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas. UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
- BALEVI, T.; UÇAN, U.S.; COŞUN, B.; KURTOGU, V.; CETINGUL, I.S. 2001. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response. **British Poultry Science** 42: 456-461.
- BARANYIOVA, E. 1987. Effect of intraperitoneal administration of amino acids on the food intake of chickens in the first month after hatching. **Acta Veterinária** 56: 417-426.

- BARRETO, M.S.R. 2007. **Uso de extratos vegetais como promotores de crescimento em 12 frangos de corte**. Dissertação (Agronomia). ESALQ, Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- BENNEJEAN, G.; MICHELE GUITTET, J.P.; PICAULT, J.F.; BOUQUET, B.; DEVAUX, D.; GAUDRY MOREAU, Y. 1978. Vaccination of one-day-old chicks against Newcastle disease using inactivated oil adjuvant vaccine and/or live vaccine. **France Avian Pathology** 7: 15-27.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F., eds. 2000. **Doença das aves**. FACTA, Campinas, São Paulo, Brasil.
- BERTECHINI, A.G. 2012. **Nutrição de Monogástricos**. Editora UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil.
- BITTENCOURT, L.C. 2006. **Efeitos da utilização de probióticos sobre parâmetros da resposta imune, hematológicos e de desempenho de frangos de corte**. Dissertação (Medicina Veterinária). USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.
- BORATTO, A.J.; LOPES, D.C.; OLIVEIRA, R.F.M.; ALBINO, L.F.T.; SÁ, L.M.; OLIVEIRA, G. A. 2004. Uso de antibióticos, de probióticos e de homeopatia em frangos de corte criados em ambiente de conforto, inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Zootecnia** 33: 1477-1485.
- BROWN, C., KING, D.J.; SEAL, B.S. 1999. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of diferente virulence. **Veterinary Pathology** 36: 125-132.
- BUTOLO, J.E. 1999. p. 85-94. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal. **Anais...** CBNA, Campinas, São Paulo, Brasil.
- BUTOLO, J.E. 1999. p. 85-94. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal. **Anais...** CBNA, Campinas, São Paulo, Brasil.
- BUTOLO, J.E. 2002. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. CBNA, Campinas, São Paulo, Brasil.
- CASTRO, A.G.M. 2005. Patologias gastrointestinais: importância do controle. In: Fórum Internacional de Avicultura, Foz do Iguaçu. **Anais...** Editora Animal World, Campinas, São Paulo, Brasil.
- CHAMBERS, P.; MILLAR, N.S.; BINGHAM, R.W.; EMMERSON, P.T. 1986. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin neuraminidase and the large protein. **Journal General and Virology** 67: 475-486.
- CHRYSOSTOME, C.A.A.M.; BELL, J.G.; DEMEY, F.; VERHULST, A. 1995. Sero prevalences to three diseases in village chickens in Benin. **Preventive Veterinary Medicine** 22: 257-261.
- CORNELI, J. 2004. **Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte**. Dissertação (Zootecnia). UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

- CORRÊIA, G. et al. 2000. Desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes promotores de crescimento. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** SBZ, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- CROMWELL, G.L. 2000. **Antimicrobial and Promicrobial Agents**. p. 401-426. In: LEWIS, A.J.; SOUTHERN, L.L. Swine Nutrition. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- DIBNER, J.J; BUTTIN, P. 2002. Use of organic acid as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research** 11: 453–463.
- FARIA, D.E.; HENRIQUE, A.P.F.; FRANZOLIN NETO, R.; MEDEIROS, A.A.; JUNQUEIRA, O.M.; FARIA FILHO, D.E. 2009. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 2. Ácidos orgânicos e probióticos. **Ciência Animal Brasileira** 10: 29-39.
- FERNANDES, J.; ROCHA, A.P.; MARTINS, G.C.F.; NUNES, J.O.; JESUS, N.A.; SANTOS, D.M.; ABREU, R.D. 2014. Avaliação do desempenho de frangos de corte submetidos a dietas suplementadas com ácido butírico sob a forma de butirato de sódio protegido. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** SBZ, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- FERNANDES, J.I.M.; BORTOLUZZI, C.; KOSMANN, R.C.; GOTTARDO, E.T.; FERNANDES, N.L.M. 2013. Suplementação dietética de levedura de cerveja e de minerais orgânicos sobre o desempenho e resposta imune em frangos de corte desafiados com a vacina de coccidiose. **Ciência Rural** 43: 1496-1502.
- FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. 2005. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science** 10: 41-47.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS [FAO] 2004. **Technology review: Newcastle disease - with special emphasis on its effect on village chickens**. FAO, Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italia.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS [FAO] 2002. **A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2. Newcastle disease vaccines: an overview**. FAO, Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italia.
- FRANCO, L.G. 2009. **Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador de desempenho em frangos de cortes**. Dissertação (Qualidade e Produtividade Animal). USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.
- FREITAS, R.T.F.; SANTOS, E.C.; TEIXEIRA, A.S. 2011. Avaliação de aditivos beneficiadores de crescimento sobre desempenho e morfometria intestinal de frangos de corte na fase inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40: 1738-1744.
- GUITTET, M.; LE COQ, H.; PICAULT, J.P. 1997. Risques de transmission de la maladie de Newcastle par des produits avicoles contaminés. **OIE Scientific and Technical Review** 16: 79-82.

- HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M.J.H. 1992. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease. **Elsevier Applied Science** 13: 151- 170
- HOFSTAD, M.S. 1988. **Diseases of poultry**. Houghton Mifflin Harcourt Publishing, Boston, Massachusetts, Estados Unidos.
- HOUDIJK, J.G.M., BOSCH, M.W.; TAMMINGA, S. 1999. Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. **Journal of Animal Science** 77: 148-158.
- HUANG, Z.; PANDA, A.; ELANKUMARAN, S.; GOVINDARAJAN, D.; ROCKEMANN, D.D.; SAMAL, S.K. 2004. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. **Journal of Virology** 78 : 4176-4184.
- HUME, R.I.; DINGLEDINE, R.; HEINEMANN, S.F. 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. **Science** 253: 1028-1031.
- JAYAWARDANE, G.W.; SPRADBROW, P.B. 1995. Mucosal immunity in chickens vaccinated with the V4 strain of Newcastle disease virus. **Veterinary Microbiology** 46: 69-77.
- JUKES, T.H.; STOKSTAD, E.L.R.; TAYLOR, R.R.; COMBS, T.J.; EDWARDS, H.M.; MEADOWS, G.B. 1950. Growth promoting effect of aureomycin on pigs. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 26: 324-330.
- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A.; KLOSTERHALFEN, B; SCHUMPELICK, V. 2002. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine** 2: 131-135.
- KOUWENHOVEN, B. 1993. **Newcastle disease**, p. 341-361. In: by J. B. MCFERRAN, J.B.; M. C. MCNULTY, M.C., eds. *Virus Infections of Birds*. Elsevier Science, Filadelfia, Pensilvânia, Estados Unidos.
- LEESON, S.; NAMKUNG, H; ANTONGIOVANNI, M.; LEE, E.H. 2005. Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. **Poultry Science** 84: 1418-1422.
- LILLY, D.M.; STILLWEL, R.H. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science** 147: 747-748.
- LIMA, A.C.F.; PIZAURO JUNIOR, J.M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E.B. 2003. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia** 32: 200-207.
- LODDI, M.M.; GONZALES, E.; TAKITA, T.S. 2000. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia** 29: 1124-1131.
- LORENÇON, L.; NUNES, R.V.N.; POZZA, P.C.; POZZA, M.S.S.; APPELT, M.D.; SILVA, W.M.S. 2007. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Scientiarum - Animal Science** 29: 151-158.
- MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. 2002. **Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal**. p. 113-123. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.;

- GONZALES, E., eds. *Fisiologia Aviária: Aplicada a frangos de corte*. FUNEP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- MACHINSKY, T.G. 2008. **Efeito da adição do ácido butírico e da fitase na digestibilidade de nutrientes em suínos na fase de crescimento**. Dissertação (Zootecnia). UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- MENDONÇA, M.O.; SAKOMURA, N.K.; SANTOS, F.R. 2008. Níveis de energia metabolizável para machos de corte de crescimento lento criados em semiconfinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37: 1433- 1440.
- MEURER, R.F.P; LEAL, P.C; ROCHA, C. 2010. Evaluation of the use of probiotics in diets with or without growth promoters for broiler chicks. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 2687-2690.
- MILLER, P.J.; DECANINI, E.L.; AFONSO, C.L. 2010. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. **Infection, Genetics and Evolution** 10: 26-35.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO [MAPA]. 2006. Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. **Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e Seus Limites das Seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos**. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- MOORE, W.E.; EVERSON, A.; LUCKEY, T.D.; MCCOY, E.; ELVEHJEM, E.A.; HART, E.B. 1946. Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. **The Journal of Biological Chemistry** 165: 437-441.
- MORAIS, B.M.; JACOB, C.M.A. 2006. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria** 82: 189-197.
- MORAN JUNIOR., E.T. 2007. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science** 86: 1043-1049.
- MURAROLLI, V.D.A. 2008. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. Dissertação (Nutrição e Produção Animal). USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.
- NEPOMUCENO, E.S.; ANDREATTI, R.L.F. 2000. Probióticos e prebióticos na avicultura. p.45-55. In: Simpósio de Sanidade Avícola. **Anais...** Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.
- NUNES, A.D. 2008. **Influência do uso de aditivos alternativos a antimicrobianos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. Dissertação (Medicina Veterinária). USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.
- OLIVEIRA, P.B. 1998. **Influência de fatores antinutricionais de alguns alimentos sobre o epitélio intestinal e o desempenho de frangos de corte**. Dissertação (Zootecnia). UEM, Maringá, Paraná, Brasil.
- ORSI, M.A. 2010. **Caracterização biológica, molecular, imunológica e estabilidade térmica das estirpes vacinais e de isolados da doença de newcastle de aves de produção industrial e migratórias no Brasil**. Tese (Ciências Básicas). Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil.

- PANDA, A.K.; RAMA RAO, S.V.; RAJU, M.V.L.N.; SHYAM SUNDER, G. 2009. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. **Assian-Australasian Journal Animal Science** 22: 1026-1031.
- PARKER, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health** 29: 4-8.
- PARTANEN, K.; MROZ, Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews** 12: 117-145.
- PAULILLO, A.C.; DORETTO JUNIOR, L. 2000. **Doença de Newcastle**. p. 267-281. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M., eds. Doenças das aves. APINCO, Campinas, São Paulo, Brasil.
- PAULILLO, A.C.; DORETTO JUNIOR, L. 2007. **Doença de Newcastle**. p. 168-181. In: ANDREATTI FILHO, R.L., ed. Saúde aviária e doenças. ROCA, São Paulo, São Paulo, Brasil.
- PAZ, A.S. 2006. **Utilização de diferentes aditivos promotores de crescimento na alimentação de frango de corte**. Dissertação (Ciências Agrárias e Ambientais). UFBA, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.
- PAZ, A.S.; ABREU, R.D.; COSTA, M.C.M.M.; JAEGER, S.M.P.L.; ROCHA, A.P.; FERREIRA, B.P.; SANTANA, R.S.; CAMPOS, B.M. 2010. Aditivos promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Produção Animal** 11: 395-402.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; BOIAGO, M.M.; ZEOLA, N.M.B.L.; SCATOLINI, A.M.; BERTANHA, V.A.; LIMA, T.M.A. 2005. Carcass and cut yields and meat qualitative traits of broilers fed diets containing probiotics and prebiotics. **Brazilian Journal of Poultry Science** 7: 169-175.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. 2003. Morfometria e Ultra-Estrutura da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte alimentados com Dietas contendo diferentes Probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 98: 125-134.
- PENZ, A.M.; SILVA, A.B.; RODRIGUEZ, O. 1993. Ácidos orgânicos na alimentação de aves. p.111-119. In: Conferência APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas. **Anais... FACTA**, Campinas, São Paulo, Brasil.
- PEROZO, F.; VILLEGAS, P.; DOLZ, R.; AFONSO, C.L.; PURVIS, L.B. 2008. The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. **Avian Pathology** 37: 237-245.
- PODOLSKY, D.K. 1993. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. **Animal Journal Physiologic** 264: 179-186.
- RAMOS, L.S.N.; LOPES, J.B.; SOUZA, S.M.M.; SILVA, F.E.S.; RIBEIRO, M.N. 2011. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40: 1738-1744.

- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. 2015. **Fármacos Antibacterianos**. p. 576-593. In: RANG, H.P.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. Rang e Dale Farmacologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- RAUW, F.; GARDIN, Y.; PALYA, V.; ANBARI, S.; LEMAIRE, S.; BOSCHMANS, M.; VAN DEN BERG, T.; LAMBRECHT, B. 2010. Improved vaccination against Newcastle disease by an in ovo recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old. **Vaccine** 28: 823–833.
- RAUW, F.; GARDIN, Y.; PALYA, V.; BORM, S. V.; GONZE, M.; LEMAIRE, S.; VAN DEN BERG, T.; LAMBRECHT, B. 2009. Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. **Vaccine** 27: 3631-3642.
- RAVINDRAN, V; KORNEGAY, E.T. 1993. Acidification of weaner diets: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 62: 1880-1886.
- REYNOLDS, D.L.; MARAGA, A.D. 2000. Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. **Avian Diseases** 44: 145-154.
- RIBEIRO, R.P.; FLEMMING, J.S.; BACILA, A.R. 2008. Uso de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), parede celular de leveduras (SSCW), Ácidos Orgânicos e avilamicina na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science** 13: 210-217.
- RICKE, S.C. 2003. Perspective on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobial. **Poultry Science** 82: 632-639.
- RUSSELL, P.H.; KOCH, G. 1993. Local antibody forming cell responses to the Hitchner B1 and Ulster strains of Newcastle disease virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 37: 165-180.
- SAKAMOTO, K.; HIROSE, H.; ONIZUKA, A.; HAYASHI, M.; FUTAMURA, N.; KAWAMURA, Y.; EZAKI, T. 2000. Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. **Journal of Surgical Research** 94: 99-106.
- SALAZAR, P.C.R.; ALBUQUERQUE, R.; TAKEARA, P.; TRINDADE NETO, M.A., ARAÚJO, L.F. 2008. Efeito dos ácidos láctico e butírico, isolados e associados, sobre o desempenho e morfometria intestinal em frangos de corte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 45: 463-471.
- SANCHES, A.L.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T.; MURGAS, L.D.S.; ALMEIDA, E.C.; VIEIRA NETO, J.; FREITAS, R.T.F. 2006. Utilização de probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. **Ciência e Agrotecnologia** 30: 774-777.
- SANTOS, B.M.; MARTINS, N.R.S.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A.M.G. 1996. Resposta imune conferida pelas amostras La Sota e VG/GA do vírus da doença de Newcastle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 48: 645-656.

SATRA, J.; TRAKARNRUNGSEE, S.; CHANTHAWORN, T.; THAOPETH, W.; PANIAGO, M.T. 2011. p. 900-908. Comparação de segurança, início e nível de proteção de três cepas vacinais entéricos apatogênico contra o desafio da doença de Newcastle. In: WVPA Congress. **Anais...** WVPA, Driffield, East Yorkshire, Reino Unido.

SCHEPPACH, W.; DUSE, G.; KUNHN, T.; KARCH, H.; BARTRAM, H.P.; RICHTER, F.; CHRISTL, S.Y.; KASPER, H. 1996. Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. **Gut** 38: 878-885.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition** 73: 361S-364S.

SCOTT, T.R. 2004. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poultry Science**. 83: 574-579.

SEAL, B.S.; KING, D.J.; SELLERS, H.S. 2000. The avian response to Newcastle disease virus. **Developmental and Comparative Immunology** 24: 257-268.

SILVA, E.N. 2000. Probióticos e Prebióticos na Alimentação de aves. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Anais... FACTA, Campinas, São Paulo, Brasil.

SMITH, J.G.; YOKOYAMA, W.H.; GERMAN, J.B. 2008. Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 38: 259-295.

STISON, A.W.; CALHOUN, M. L. 1982. **Sistema digestivo**. p.163-211. In: DELLMANN, H.; BROWN, E.M. **Histologia veterinária**. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

STURKIE, P.D. 2014. **Avian Physiology**. Academic Press, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos.

TAMAS, F.; ETCHARREN, L.; ROJAS, A.; GARDIN, Y. 2004. Comparative laboratory challenge trial using apatogenic enterotropic (phy.lmv.42 strain) or tracheotropic lentogenic (la sota strain) live and vaccines associated or not with inactivated and vaccines. In: World Poultry Congress. **Anais...** WPC, Beekbergen, Holanda.

TOLEDO, G.S.P.; COSTA, P.T.C.; SILVA, L.P.; PINTO, D.; FERREIRA, P.; POLETTI, C.J. 2007. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo como promotores, antibióticos e ou fitoterápicos, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural** 37: 1761.

UNI, Z., NOY, Y., SKLAN, D. 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poultry. **Poultry Science** 78: 215-222.

UNI, Z.; FERKET, R.P. 2004. Methods for early nutrition and their potential. **Poultry Science** 83: 101-111.

UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION [USAHA]. 2008. **Foreign Animal Diseases**. 17ed. USAHA, Boca Publications, Boca Raton, Florida, Estados Unidos.

- VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK J.; DE SMET I.; PASMANS F. 2004. Interactions of butyric acid- and acetic acid-treated Salmonella with chicken primary cecal epithelial cells in vitro. **Avian Diseases** 48: 384-391.
- VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L.; TORRES, C.A.; FREITAS, D.M.; BERRES, J. 2008. Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos láctico, fórmico, acético e fosfórico no alimento ou na água. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37: 296-302.
- WALKER, W.A.; DUFF, L.C. 1998. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. **Journal Nutrition Biochemical** 9: 668-675.
- ZAKAY-RONES, Z.; LEVY, R. 1973. Immunologic response of chicks to inactivated newcastle disease virus. **Avian Diseases** 17: 450-452.
- ZULKIFLI, H.; ABDULLAH, N; AZRIN, N.M.; HO, Y.W. 2000. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing Lactobacillus cultures and oxutetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science** 41: 593-597.