

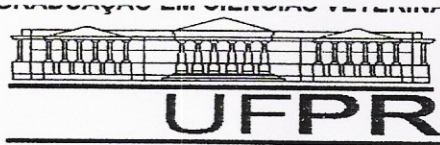
EDUARDO DE CAMPOS CARDOZO

**UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO (*BACILLUS SUBTILIS*) COMO ADITIVO
ALIMENTAR EM DIETAS DE FRANGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Dahlke


**CURITIBA
2006**



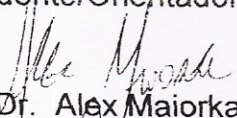
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“UTILIZAÇÃO DO PROBIÓTICO (*Bacillus subtilis*) COMO ADITIVO ALIMENTAR EM DIETAS DE FRANGOS”** apresentada pelo Mestrando EDUARDO DE CAMPOS CARDOZO, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APROVADO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Produção Animal.

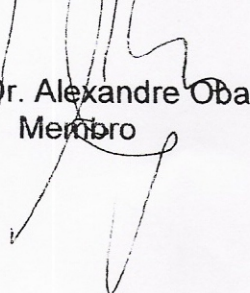
Curitiba, 27 de outubro de 2006.



Prof. Dr. Fabiano Dahlke
Presidente/Orientador



Prof. Dr. Alex Maiorka
Membro



Prof. Dr. Alexandre Oba
Membro

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, principalmente, minha mãe por todo o incentivo, amor, carinho e apoio moral e financeiro.

Ao meu orientador Professor Fabiano Dahlke pela sua orientação, ensinamentos, paciência, amizade, confiança e todo o apoio fornecido para minha formação profissional.

Ao professor Alex Maiorka pela convivência, ensinamentos e seu profissionalismo.

Ao professor André Ostrensky pela sua motivação, amizade e oportunidades.

Aos meus colegas de mestrado Michelly Opalinski, Gisele Muraro, Cátia Pinheiro pela amizade, companheirismo e paciência com minha pessoa.

A todos os alunos da graduação que contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 HISTÓRICO DOS ADITIVOS ALIMENTARES.....	3
2.2. ANTIBIÓTICOS COMO ADITIVOS ALIMENTARES.....	5
2.2.1 Modo de ação dos antibióticos.....	8
2.2.2 Efeito dos antimicrobianos na economia de nutrientes.....	9
2.2.3 Efeito protetor dos antimicrobianos contra a produção de toxinas.....	10
2.2.4 Efeito dos antimicrobianos no controle de doenças sub-clínicas.....	10
2.3 PROBIÓTICOS.....	11
2.3.1 Histórico.....	14
2.3.2 Microflora intestinal.....	16
2.3.3 Composição e utilização dos probióticos.....	19
2.3.4 Propriedades desejáveis de um probiótico.....	21
2.3.5 Mecanismos de ação.....	22
2.3.5.1 Exclusão competitiva.....	23
2.3.5.2 Produção de substâncias antibacterianas e enzimas.....	24
2.3.5.3 Competição por nutrientes.....	25
2.3.5.4 Estímulo ao sistema imune.....	25
3. MATERIAL E METODOS.....	27
3.1 Local, duração, e aves experimentais.....	27
3.2 Instalações e manejo.....	27
3.3 Dietas experimentais.....	27
3.4 Tratamentos.....	29
3.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	29
3.6 Determinação da concentração microbiana.....	29
3.7 Índices avaliados.....	30
3.7.1 Ganho de peso (GP).....	30
3.7.2 Consumo de ração (CR).....	30

3.7.3 Conversão alimentar (CA).....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Consumo de ração.....	31
4.2 Ganho de peso.....	33
4.3 Conversão alimentar.....	34
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

RELAÇÃO DE TABELAS

1. Composição das dietas.....	52
2. Consumo de ração (CR) em gramas, de frangos alimentados com dietas contendo diferentes aditivos alimentares, de 1 a 42 dias de idade.....	56
3. Ganho de peso (GP), em gramas, de frangos alimentados com diferentes aditivos alimentares, de 1 a 42 dias de idade.....	57
4. Conversão alimentar (CA), g/g, de frangos alimentados com diferentes aditivos alimentares, de 1 a 42 dias de idade.....	58

UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO (*BACILLUS SUBTILIS*) COMO ADITIVO ALIMENTAR EM DIETAS DE FRANGOS

RESUMO

O experimento teve por objetivo avaliar alguns efeitos zootécnicos da utilização de um probiótico na dieta, constituído por microorganismos de *Bacillus subtilis* (cepa DSM 17299), e para tanto, parâmetros produtivos como, consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar de frangos foram avaliados. Foram utilizados 1.200 pintos de corte, machos, da linhagem Ross, criados de 1 a 42 dias de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente ao acaso, formado por 4 tratamentos com 10 repetições de 30 aves. Os tratamentos foram constituídos por: T1 – Controle Negativo (dieta basal, sem aditivo); T2 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (8×10^5 CFUs/g de alimento); T3 – Controle Positivo (avilamicina + anticoccidiano, de 1-35 dias de idade) e T4 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (3×10^5 CFUs/g de alimento). O uso de aditivo alimentar não promoveu melhora no ganho de peso, entretanto, o consumo de ração foi maior nas dietas isentas de antibióticos ($P < 0,05$), nas idades estudadas e, conseqüentemente, houve uma significativa melhora na conversão alimentar dos frangos de corte que ingeriram ração com antibióticos e dos frangos alimentados com rações adicionadas de *B. subtilis* ($P < 0,05$). Portanto, conclui-se que o probiótico *Bacillus subtilis* (cepa DSM 17299), melhora a conversão alimentar em relação ao tratamento controle e pode, conseqüentemente, ser usado como aditivo alimentar em dietas de frangos.

Palavra chave: Antibiótico, desempenho, frangos, probiótico.

UTILIZATION OF PROBIOTIC (*BACILLUS SUBTILIS*) AS A GROWTH PROMOTER IN THE CHICKEN'S FEEDING DIET

ABSTRACT

The experiment had the purpose of value some the effect of using a probiotic in diet, constitute of *Bacillus subtilis* (strain DSM 17299), therefore, the following parameters were measured: feed intake, daily weight gain and feed conversion ratio of broilers. Were used 1200 Chickens, male, Ross strain, raised from 1 to 42 days of age. A completely randomized experimental design was used, constitute by 4 treatments with 10 repetitions of 30 birds. The treatments were constituted. T1 – Negative control (feed basal, without additive); T2 - Negative control + *Bacillus subtilis* (8×10^5 CFUs/g de feeding); T3 – positive control (avilamicyn + coccidiano, of 1 until 35 days of age) and T4 – negative control + *Bacillus subtilis* (3×10^5 CFUs/g of feed). The use of growth promoter did not improve the daily weight gain, meanwhile, the feed intake was more in diets without antibiotics ($P < 0,05$), in ages studied and, therefore, there was a improvement in feed conversion ratio of broilers feeded feed with antibiotics and of those with diets add of *B. subtilis* ($P < 0,05$). Therefore, conclude that the *Bacillus subtilis* probiotic can be an alternative of the use of antibiotics growth promoters, since it improve the feed conversion ratio in broiler's diet.

Key words: Antibiotic, broiler, performance, probiotic.

1. INTRODUÇÃO

A pouca diversidade da microflora intestinal de aves recém nascidas, além de ser considerada como um fator limitante para o crescimento, também possibilita a colonização intestinal por patógenos entéricos (LODDI, 2001). Da mesma forma, a ausência de contato com a microbiota natural logo após o nascimento pode afetar o desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) e, por conseqüência, prejudicar o crescimento das aves (GHADBAN, 2002). Por isso desde a década de 50 os efeitos negativos desse processo têm sido contornados com o uso contínuo na ração de antibióticos em doses sub-terapêuticas. Entretanto, no momento, o uso desses produtos está sendo questionado devido à sua possível relação com a resistência aos antibióticos usados na antibioticoterapia humana (PALERMO, 2006).

Existe também uma forte influência da opinião pública, a qual é formada por pressão de grupos organizados, meios de comunicação em massa, acesso à Internet entre outros aspectos aliada a globalização da avicultura que tem acarretado mudanças importantes na produção de frangos. O comércio internacional vem se adequando as novas legislações sobre consumo de alimentos de origem animal da Europa, tais como: não uso de antibióticos aditivos alimentares e ainda, abate orientado para crenças religiosas (GONZALES, 2004).

A produção animal vem se adaptando a estas crescentes exigências e, neste sentido, é cada vez mais intensa a preocupação com as condições sob as quais os animais são criados e as implicações que isso pode acarretar à qualidade do produto final (GHADMAN, 2002). Dentro desse contexto, a utilização de probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, entre outros têm recebido atenção por parte de pesquisadores como eventuais substitutos dos atuais antibióticos utilizados como aditivos alimentares, pois não deixam resíduos nas carcaças (MENTEN e PEDROSO, 2005). Entre estas alternativas destacam-se os probióticos, os quais são produtos constituídos por microrganismos vivos usados com o objetivo de afetar benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989), de forma a restringir o uso de antibióticos apenas na forma terapêutica.

A utilização de probióticos como aditivos alimentares supostamente podem proporcionar melhor desempenho (BERTECHINI e HOSSAIN, 1993; WOLKE et al.,

1996; JIN et al., 1998), porém, para que este benefício seja alcançado é necessário avaliar fatores como, idade do animal, tipo de probiótico, viabilidade dos microrganismos no momento de serem agregados às rações, cepas utilizadas, condições de armazenamento, condições de manejo (nível de estresse) e sanidade (FURLAN et al, 2004).

Assim, os objetivos do presente trabalho foram avaliar os efeitos da adição do probiótico *Bacillus subtilis* (cepa DSM 17299), como aditivo alimentar, em dietas de frangos de corte. Para tanto, parâmetros zootécnicos, como consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar foram avaliados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico dos aditivos alimentares

Em 1943 Alexander Fleming descobre a penicilina, amplamente utilizada durante a segunda Guerra Mundial com o escopo de prevenir mortes causadas por ferimentos infectados. Iniciava-se a chamada “era dos antibióticos”, pois outros antibióticos foram descobertos e passaram a ser utilizados de forma intensiva na terapia humana contra doenças bacterianas (GHADBAN, 2002).

A partir da década de 50 os antibióticos começaram a ser utilizados na alimentação animal com o intuito de cura e de prevenção de doenças (BIOTECNAL, 1999). Porém, observou-se que estes compostos também possuíam a capacidade de melhorar o desempenho de animais de produção através da exclusão de microorganismos que competem pelo alimento no trato gastrintestinal (MACARI e FURLAN, 2005). Naquele momento foi descoberto algo que mudaria totalmente os sistemas de criação, haja vista os resultados alcançados rapidamente através da utilização de pequenas doses de antibióticos. Os produtores passaram a usar estes compostos reiteradamente para o crescimento rápido dos animais e também para a prevenção de doenças (BIOTECNAL, 1999). Deve-se também levar em consideração que as condições de higiene daquela época eram deficientes se comparadas às de hoje e por isso os resultados obtidos foram de tamanha expressividade. Praticamente todos os antibióticos usados na terapêutica humana e veterinária passaram a ser utilizados como aditivos com o propósito de melhorar o desempenho zootécnico dos animais (MACARI e FURLAN, 2005). Na década de 60, surgiram as primeiras críticas oriundas de profissionais da área de produção animal e de saúde humana em relação ao uso indiscriminado dos antibióticos na alimentação animal. Criou-se a hipótese de que o uso diário e constante sem critérios deste tipo de medicação, não apenas provocaria a destruição de bactérias patogênicas, mas também das benéficas e, além disso, poderia acarretar o aparecimento de resistência bacteriana o que levaria a uma queda na eficiência dos antibióticos. Assim os animais poderiam ser acometidos por uma infecção provocada por um germe resistente ao antibiótico utilizado, além da possível transmissão

destas bactérias resistentes ao homem através do consumo de carne e derivados ou contato com os animais (GHADBAN, 2002).

A partir da década de 70, órgãos de saúde internacionais como o FDA (Food and Drug Administration, dos EUA), passaram a se preocupar com as rações animal que continham antibióticos, surgindo então às primeiras normas limitando o uso destes na alimentação animal. A preocupação era proteger o consumidor, uma vez que a presença de resíduos de antimicrobianos como a penicilina, poderia causar reações alérgicas em pessoas sensíveis, além de interferir no tratamento de infecções humanas devido ao aparecimento de bactérias resistentes (BIOTECNAL, 1999). Na década de 80 a Comunidade Européia proibiu o uso de penicilina, tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, estreptomicina, neomicina, higromicina, bacitracina de magnésio, alegando que a atividade destes compostos quando utilizados na alimentação animal, poderia intervir na terapêutica humana (UTIYAMA, 2004). Após estas proibições, pesquisadores da área de nutrição animal começaram a buscar alternativas na tentativa de encontrar novos aditivos alimentares que pudessem substituir de forma similar os antibióticos. O interesse centralizou-se em um dos mecanismos de defesa natural dos animais que até então havia recebido pouca atenção: a população de bactérias benéficas que está presente no trato gastrointestinal. O *Lactobacillus acidophilus* começou a ser utilizado como suplemento alimentar para animais (GHADBAN, 2002).

Na década de 90, a Portaria número 159 de 13/06/92 do Ministério da Agricultura proibiu o uso de determinadas drogas como aditivos alimentares nas rações animais, deixando evidente a preocupação do Brasil com o uso de antibióticos. Entre as drogas vedadas estão as tetraciclina, terramicinas, clortetraciclina e penicilina.

Desde então novos aditivos alimentares começaram a ser testados e utilizados na alimentação animal, como os probióticos, prebióticos, simbióticos, enzimas entre outros.

Novas proibições surgiram: a nitrofurazona, a furazolidona, o cloranfenicol (Portaria número 448 de 10/09/98), a avoparcina (Portaria Numero 819 de 16/10/98), os arsenicais, antimonianais (Portaria número 31 de 29/01/2002), o cloranfenicol e os nitrofuranos (Instrução normativa número 38 de 08/05/2002) (UTIYAMA, 2004).

Na união européia, até dezembro de 2005, ainda eram liberados a Flavomicina, Avilamicina, Salinomicina e Monensina sódica, porém atualmente todos os antimicrobianos estão proibidos para uso como aditivo alimentar (PALERMO, 2006).

2.2. Antibióticos como aditivos alimentares

Os antibióticos são os aditivos alimentares de uso mais generalizado na produção animal. São produzidos por fungos, leveduras ou bactérias que atuam contra bactérias (UTIYAMA, 2004).

Os antimicrobianos são frequentemente utilizados para o tratamento terapêutico e até profilático de doenças em aves e desde 1946, também são utilizados como aditivos alimentares para melhorar o desempenho de frangos de corte, porquanto seu grande potencial para melhorar a conversão alimentar, ganho de peso e diminuir a mortalidade (PALERMO, 2006).

Todavia, apesar dos efeitos benéficos dos antibióticos como aditivos, a utilização de antibióticos aditivos alimentares pertencentes aos mesmos grupos de drogas empregadas na terapêutica humana e veterinária vem sofrendo proibições mundialmente, devido à possibilidade de bactérias patogênicas se tornarem resistentes aos antibióticos utilizados na terapêutica humana e veterinária e as fortes pressões impostas pelos consumidores (FLEMMING, 2005b). Alguns fatores contribuem para o acréscimo desta resistência bacteriana como, o confinamento de animais e alguns vetores como insetos e pássaros (CHAIRMAN et al., 2004).

O primeiro questionamento envolvendo antibióticos aditivos alimentares surgiu na Grã-Bretanha ainda em 1969. Devido ao aumento na ocorrência de amostras de *Salmonella* Typhimurium resistentes a vários antibióticos. O célebre Relatório Swann foi apresentado por cientistas ao Parlamento Inglês recomendando que drogas como as tetraciclina e as penicilinas, úteis para tratamentos em humanos, fossem banidas como aditivos alimentares (SCHWARZ et al, 2001).

Bactérias resistentes a antibióticos existem naturalmente em qualquer população e são selecionadas pelo uso do antimicrobiano, que elimina apenas aquelas sensíveis. O uso contínuo destes compostos seleciona clones resistentes a

vários antimicrobianos, chegando ao ponto em que nenhum antibiótico terá efeito. Algumas amostras de estafilococos são sensíveis apenas à vancomicina. Estas amostras, por sua vez, poderão ser selecionadas para resistência inclusive a este antibiótico, deixando as infecções por aquela bactéria sem opção de tratamento (ARESTRUP, 1999).

A resistência ocorre quando as bactérias desenvolvem um mecanismo de sobrevivência ao uso do aditivo alimentar, geralmente associado ao uso de doses sub-terapêuticas de forma continuada e por longos períodos de tempo. Esta resistência é descrita por EDENS (2003) como: decorrente do aumento da resistência à absorção do antibiótico pela parede celular, anulando total ou parcialmente o seu efeito; aumento do metabolismo do antibiótico com sua transformação em produto não lesivo às bactérias e por último a resistência é adquirida pela transformação em metabólitos alternativos que permite aos microorganismos uma coexistência com a droga.

Vários patógenos como a *Escherichia coli*, *Campylobacter spp* e *Salmonella spp* têm sido implicados como redutores do crescimento de aves. Possíveis mecanismos envolvidos nesta redução são: produção de toxinas, utilização de nutrientes essenciais do hospedeiro e supressão de microorganismos que sintetizam vitaminas e outros compostos nutricionais (MILES, 1993). Além disso, com frequência crescente produtos avícolas têm sido relacionados com toxinfecções alimentares em humanos em vários países, sugerindo que produtos elaborados com carne de aves portadoras de bactérias possam ser fontes de infecção (SANTOS et al., 2005).

Entre a profusa informação veiculada, pode citar-se, a modo de exemplo, que na Coreia isolou-se *Salmonella* de 25,9% das amostras de carne de frango, sendo *S. enteritidis* um dos sorotipos predominantes. Além disso, todas as *Salmonellas* isoladas apresentaram resistência múltipla a antibióticos, dentre eles a penicilina e vancomicina, sendo uma amostra de *S. enteritidis* resistente a doze antibióticos (CHANG, 2000).

Campylobacter spp é outro agente de infecção alimentar humano relacionado com a ingestão de produtos avícolas. Na Itália foi detectado *Campylobacter spp.* em 53,9% de amostras de carne bovina, 63,5% de suínos e 82,9% de frangos, com

vários isolados apresentando resistência múltipla a antibacterianos (PEZZOTTI, 2003).

SANTOS et al. (2005), também citam que outras bactérias são frequentemente envolvidas em toxinfecções alimentares humanas, como as integrantes do gênero *Listeria* e que no Brasil também há vários registros sobre ocorrência de bactérias isoladas de aves ou seus produtos, potencialmente produtoras de toxinfecções alimentares em humanos.

Levando em consideração esta alta freqüência de bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos presentes em produtos de origem animal, assim como o aumento de sua resistência aos antimicrobianos, atualmente vem sendo muito questionado o uso indiscriminado de antimicrobianos na alimentação animal. Neste ano todos os antibióticos foram proibidos como aditivos em rações animais na União Européia e a que tudo indica, este indeferimento deve continuar em outros países (PALERMO, 2006).

Considerando-se que esta proibição de antimicrobianos como aditivos alimentares devem continuar mundialmente, algumas estratégias vêm sendo adotadas para contornar os malefícios advindos da retirada dos antibióticos das rações animais, como seleção genética de animais resistentes a doenças, vacinações, assim como novos suplementos alimentares passíveis de substituir de forma similar os antimicrobianos como, probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos entre outros (CHAIRMAN et al., 2004).

Indubitavelmente é difícil imaginar a produção animal nos níveis atuais sem o uso de aditivos alimentares, com o escopo de prevenir doenças e melhorar o desempenho animal. Contudo alguns substitutos vêm sendo estudados, como os probióticos.

2.2.1 Modos de ação dos antibióticos

Existem dois tipos de ação dos antibióticos: a morte ou a parada de seu crescimento e reprodução. No primeiro caso, denomina-se efeito bactericida e no segundo caso, efeito bacteriostático (GONZALES, 2004). Em teoria, seria possível obter um efeito bactericida de qualquer antibiótico, desde que se aumentasse a concentração do antimicrobiano. Estes efeitos podem se dar por interferência na síntese da parede celular, alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, interferências na replicação cromossômica e na síntese protéica (UTIYAMA, 2004).

Apesar de parecer óbvio, o efeito dos antimicrobianos sobre os microorganismos, seus efeitos ainda não foram totalmente elucidados. Desde o início da década de 50 foram realizados diversos estudos com o intuito de desvendar o mecanismo de ação, porém até hoje não existe um consenso (GONZALES, 2004). Alguns antibióticos são absorvidos e atingem a circulação sistêmica do animal, e contrariamente, existem muitos outros que são pouco absorvidos e a diferença no grau de absorção não pode estar realmente associada com a eficácia dos antibióticos como aditivos alimentares, mesmo que possa ter influência sobre uma infecção sistêmica. O único aspecto unânime é de os antibióticos agirem sobre o controle de bactérias indesejáveis, promovendo um desequilíbrio na microflora gastrintestinal em favor de bactérias favoráveis e/ou reduzindo o número total de bactérias no TGI, principalmente das Gram positivas (BUTOLO, 2002).

A eficácia dos antibióticos em equilibrar a flora do trato gastrintestinal resultando em benefícios zootécnicos é maior para animais jovens em relação aos mais velhos. Os benefícios também são maiores em meio ambiente contaminado do que nos limpos, em animais com menor resistência a doenças que os mais saudáveis e em condições de maior densidade de criação, isto é, está muito relacionada com a condição de resistência dos animais e o nível de desafio a doenças determinadas por bactérias (GONZALES, 2004). Se animais fossem criados em um ambiente livre de patógenos, o uso destes compostos não produziria ganhos zootécnicos (MENTEN e PEDROSO, 2005). Somente este fato demonstra

que o principal modo de ação dos antibióticos é sobre o controle da população bacteriana.

Todavia, LANGHOUT (2005) cita que novas técnicas poderão ajudar a entender os mecanismos de ação dos antibióticos aditivos alimentares, como as técnicas moleculares. Este tipo de tecnologia poderá fazer a caracterização de ecossistemas microbianos complexos, através do método que analisa o DNA ribossomal nas bactérias resultando em um perfil da microflora em uma amostra específica, ou seja, baseia-se na codificação do DNA em um gene específico, o 16SrDNA que é um gene universal presente em todas as bactérias. Estas regiões podem ser conservadas a partir das bactérias e permitem a amplificação enzimática do 16SrDNA utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). As diferenças na área não conservada (a parte ligada ao gene universal) permitem então estabelecer uma diferenciação entre diferentes bactérias. Este autor afirma ainda que diferente dos métodos tradicionais, que analisam as populações bacterianas, as técnicas moleculares possibilitam a detecção de bactérias que não podem ser cultivadas *in vitro*.

Apesar de não haver conclusões definitivas a respeito dos modos de ação dos antimicrobianos serão citados adiante alguns possíveis mecanismos de ação.

2.2.2 Efeito dos antimicrobianos na economia de nutrientes

Ocorre uma ação seletiva por parte dos antibióticos, desfavorecendo o crescimento de bactérias que apenas competem pelo alimento com o hospedeiro e assim, conseqüentemente, favorecendo bactérias que sintetizam vitaminas (BUTOLO, 1998). Este mesmo autor também cita que estes compostos atuam aumentando a capacidade de absorção de nutrientes no trato gastrointestinal.

Os agentes antimicrobianos reduzem a irritação de mucosa e conseqüentemente aumentam a área de absorção de nutrientes, levando a crer que o animal necessita de uma menor quantidade de nutrientes para manutenção dos tecidos do trato gastrointestinal (UTIYAMA, 2004).

2.2.3 Efeito protetor dos antimicrobianos contra a produção de toxinas

Os antimicrobianos na dieta reduzem a amônia e outros metabólicos tóxicos (aminas e endotoxinas) produzidos pela microbiota, e assim protegem o epitélio intestinal (BUTOLO, 1999). Reduzem, também, o número de microorganismos ureolíticos e as suas conseqüentes hidrólises de uréia e os níveis de amônia e aminas locais. Um exemplo desta ação é observado com a virginiamicina, cujo uso reduz também a concentração de ácidos graxos de cadeias curtas, incluindo ácido láctico na porção proximal do intestino delgado. A conseqüência é uma menor irritação da mucosa intestinal e, portanto, menor espessamento e melhor área absorptiva (GONZALES, 2004). A toxicidade destas substâncias também aumenta o “turnover” celular no epitélio intestinal e causa maior gasto de energia e proteínas para o animal. Portanto, aceita-se que o mecanismo de proteção do epitélio contra substâncias tóxicas pode aumentar o desempenho de animais alimentados com agentes antimicrobianos, devido a menor demanda energética do trato gastrointestinal (UTIYAMA, 2004).

2.2.4 Efeito dos antimicrobianos no controle de doenças sub-clínicas

O controle de doença sub-clínica ou de doenças causadas por bactérias oportunistas, como a enterite necrótica causada pelo *Clostridium perfringens*, é outro modo de ação pelos quais os antibióticos melhoram o desempenho da ave. A virginiamicina, a lincomicina e a bacitracina de zinco são os aditivos alimentares que podem ser utilizados como preventivos contra a ocorrência de enterite necrótica (GONZALES, 2004).

Segundo UTIYAMA (2004), o estímulo crônico do sistema imunológico, respondendo às doenças sub-clínicas, pode promover redução no consumo de ração e demanda de nutrientes que poderiam ser utilizados na síntese protéica. Portanto, o controle destas doenças sub-clínicas permite que os animais expressem de maneira mais intensa o seu potencial genético para crescimento.

2.3. Probióticos

A palavra probiótico é derivada do grego Pro: a favor e bio: vida, ou seja, a favor da vida. Já, em contraposição, o termo antibiótico significa contra a vida (GHADBAN, 2002).

GHADBAN (2002) define probiótico como um produto capaz de auxiliar a flora intestinal a manter sua dominação sobre os microorganismos patogênicos. FULLER (1989) define probiótico como um microingrediente à base de microorganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o balanço microbiano intestinal. Probióticos, segundo o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2004), são cepas específicas de várias espécies de microorganismos que agem como auxiliares na recomposição da microbiota intestinal dos animais, diminuindo a ocorrência dos microorganismos patogênicos ou indesejáveis. Independente do conceito utilizado, os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem resistência às drogas, o que os faz candidatos preferenciais para substituir os antimicrobianos como aditivos alimentares. Estes produtos vêm sendo utilizados a anos na alimentação humana, tanto com finalidade profilática quanto terapêutica, entretanto a indústria avícola ainda apresenta certa resistência ao seu uso (SANTOS et al., 2005).

A base do conceito da utilização de probióticos é a manipulação da microbiota intestinal que influencia benéficamente a saúde do animal hospedeiro e assim ajuda a manter a probiose do animal, que conceitualmente é a capacidade dos microorganismos normais do trato intestinal de resistir ao crescimento exagerado de cepas normais e ao estabelecimento de cepas invasoras (GHADBAN, 2002). Os probióticos são utilizados então para reforçar ou restabelecer esta probiose quando a mesma for alterada por fatores adversos como: mudança de alimentação, estresse, tratamento com antibióticos, entre outros (FURLAN et al., 2004).

Os probióticos também podem substituir os antibióticos de forma terapêutica, desde que, utilizados logo no início do aparecimento dos sinais clínicos de uma diarreia alimentar, pois se o quadro for muito severo somente os antibióticos terão efeito, mas mesmo assim é aconselhável utilizar probiótico de forma consorciada, na

medida em que este vai ajudar a repovoar a flora intestinal, após o saneamento promovido pelos antibióticos (GHADBAN, 2002).

Quanto melhores forem às condições sanitárias e menos estresse o animal sofrer e mais equilibrada for à flora intestinal, menor o efeito dos antibióticos e probióticos. Mas, sabe-se, o quanto é difícil manter nas condições de criação comercial um animal que não sofra de estresse e conviva em um ambiente livre de microorganismos patogênicos e o que ocorre atualmente é um aumento da contaminação das instalações (MACARI e FURLAN, 2005).

Na literatura são encontrados resultados controversos sobre o uso de probióticos, possivelmente devido a vários fatores como a cepa que está sendo utilizada, a quantidade de microorganismos empregada, além das condições de manejo e estresse, já citadas, e das formas de fabricação e armazenamento do produto (MENTEN e PEDROSO, 2005).

Vários aspectos da aplicação dos probióticos, em frangos de corte, vêm sendo pesquisados, entre eles os seus efeitos nos índices de produtividade. É comum encontrarmos trabalhos que não apresentam resultados positivos com o uso destes microorganismos, como ESTRADA (2001), o qual constatou que a administração de *Bifidobacterium bifidum* não provocou efeito significativo no crescimento animal. REYES (2000) obteve resultados similares com bactérias ácido lácticas.

PELICANO et al. (2004), avaliando o desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias recebendo probiótico *Bacillus subtilis*, observaram uma melhora na conversão alimentar no período de 22 a 35 dias, porém, este efeito não foi observado nas demais fases, concluindo que este aditivo alimentar não afetou o desempenho das aves. KANASHIRO et al. (2001), avaliaram a influência do uso contínuo de probiótico em dietas de frangos de corte sobre atividades enzimáticas e concentração de colesterol séricos. As enzimas avaliadas foram aspartato, aminotransferase, alanina aminotransferase, creatinaquinase, fosfatase alcalina e amilase sérica, as quais poderiam refletir o estado geral metabólico da ave e assim indicar uma interferência benéfica ou adversa do probiótico. Estes autores concluíram que a administração de probióticos não interferiu na atividade das enzimas séricas analisadas e não alterou significativamente as concentrações de colesterol sérico.

MAHDAVI et al. (2005), citam que nem sempre são observados resultados benéficos com o uso de probióticos, pois para tanto depende de fatores como a idade do animal, tipo de bactérias a ser utilizada, viabilidade dos microorganismos no momento de serem agregados às rações, condições de armazenamento, qualidade dos microorganismos, condições de manejo e sanidade. Em contraposição, várias pesquisas realizadas nos últimos anos mostraram resultados extremamente promissores pela adição de probióticos na dieta de frangos de corte.

WOLKE et al. (1996), avaliaram o probiótico *Bacillus natto* na alimentação de frangos de corte do primeiro aos 42 dias de idade e observaram resultados significativos para ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar para os animais que receberam rações contendo probiótico comparada a uma ração sem aditivos.

ARAUJO et al. (2000), avaliando o uso de antibiótico e probiótico para frangos de corte no período de 24 a 41 dias de idade, observaram que não houve diferença estatística para os parâmetros de ganho de peso e consumo de ração, todavia observaram uma melhor conversão alimentar para as aves que receberam ração contendo probiótico e antibiótico e assim concluíram que a associação dos dois aditivos alimentares foi mais benéfica para o desempenho das aves.

SILVA et al. (2000b) avaliando uma ração contendo probiótico *Bacillus subtilis* e uma ração contendo antibiótico comercial não observaram diferença significativa para consumo de ração, porém as aves que ingeriram rações com aditivos, independentemente de serem antibióticos ou probióticos, tiveram uma conversão alimentar melhor em relação à ração testemunha sem aditivos.

CORREA et al. (2003), testaram a eficiência de um poliprobótico contendo *Bacillus subtilis* em comparação ao antibiótico Bacitracina de Zinco em frangos de corte. Eles observaram um menor consumo de ração com uma conseqüente conversão alimentar melhor, com a ração contendo o probiótico na fase inicial de criação.

FLEMMING et al. (2005a), avaliariam o uso de um probiótico (*Bacillus subtilis*), simbiótico e um antibiótico (avilamicina). No resultado acumulado (início ao abate) o probiótico apresentou os melhores resultados para ganho de peso, em relação ao controle, não diferindo, entretanto do simbiótico e do antibiótico. Estes autores sugerem que os melhores resultados de ganho de peso e conversão

alimentar apresentados pelo probiótico em comparação aos grupos controle e antibiótico na fase inicial, é devido ao melhor equilíbrio entre os microorganismos do probiótico que seria a flora desejável com a flora indesejável.

2.3.1 Histórico

Pode-se dizer que a história de probióticos, na forma de leite fermentado, iniciou-se a centenas de anos, quando médicos práticos do oriente médio prescreviam iogurte e outros leites fermentados para cura de desarranjos estomacais e intestinais. Todavia, somente no início do último século passou a ser estudada de forma mais racional (GHADBAN, 2002).

Em 1907, Ilka Metchnikoff, pesquisador russo do instituto Pasteur em Paris, demonstrou que a ingestão regular de leites fermentados melhorava a saúde (TOURNUT, 1998). Após observar a longevidade de camponeses búlgaros, decidiu pesquisar a dieta e o ambiente em que estes viviam e descobriu que a alimentação deste povo consistia basicamente de leite fermentado à base de bactérias produtoras de ácido láctico. Este pesquisador tentou, então, verificar os componentes responsáveis por esta peculiaridade. Realizou experimentos com humanos usando um microorganismo isolado do leite fermentado consumido na região, o qual recebeu o nome de *Bacillus bulgaricus* que atualmente é conhecido como *Lactobacillus bulgaricus*, um dos microorganismos básicos utilizado na elaboração do iogurte atual (BIOTECNAL, 1999). Um ano após esta descoberta Metchnikoff escreveu um livro “The prolongation of life”, no qual atribui a longevidade da população búlgara à baixíssima incidência de câncer de cólon e a proteção contra infecções gastrintestinais ao grande consumo de leite fermentado por bactérias produtoras de ácido láctico (BIOTECNAL, 1999). Ilka, especulou a possibilidade de bactérias patogênicas expelirem substâncias nocivas ao hospedeiro e através da ingestão de elementos benéficos, os quais acreditavam estarem presentes no iogurte, poderia de alguma forma melhorar o ambiente intestinal – hoje conhecida como manipulação da população microbiana (BIOTECNAL, 1999). Ele sugeriu que a ingestão constante de microorganismos benéficos deveria colonizar o trato gastrintestinal e os indesejáveis serem eliminados, conseqüentemente, fortalecendo a saúde do hospedeiro. Porém, TOURNUT (1998) cita que mais tarde cientistas

demonstraram que os microorganismos do iogurte, apesar de seu efeito benéfico, não conseguiam se fixar ao intestino, e como é nele que os efeitos são manifestados seria melhor usar um habitante natural do mesmo. Segundo GHADBAN (2002), o *Lactobacillus acidophilus* foi o primeiro microorganismo a ser isolado do intestino. Desde aquela data muitos estudos começaram a ser realizados com o escopo de explicar os efeitos benéficos oriundos da ingestão de produtos fermentados e atualmente vários outros microorganismos já foram isolados (BUTOLO, 1999).

Em 1960, Richard Parker, professor de microbiologia da Oregon Medical School, usou pela primeira vez o termo probiótico que significa a favor da vida (UTIYAMA, 2004).

A década de 70 foi marcada pelo início do uso de um probiótico para fim de produção animal, o *Lactobacillus acidophilus*. Este fato culminou com a preocupação, por parte das autoridades e órgãos de saúde animal internacionais, com as rações animais contendo antibióticos. A preocupação resultou na interdição do uso de algumas dessas substâncias alegando que a eficácia desses componentes poderia ser diminuída quando utilizados em humanos, se administradas continuamente em animais (SANTOS e TURNES, 2005). No Brasil, em 1992, a Portaria nº159, do Ministério da Agricultura proibiu o uso de antimicrobianos para uso como aditivos alimentares em rações, como as tetraciclina, penicilinas, cloranfenicol e sulfonamidas. O Ofício circular 19/98 de 16/11/98 do Ministério da Agricultura, suspende o uso de avoparcina e a Portaria 448 de 10/9/98 proíbe a fabricação, importação e uso de cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona. Atualmente, os aditivos autorizados para frangos de corte são: avilamicina, colistina, flavomicina, lincomicina, tilosina, virginamicina, bacitracina de zinco, espiramicina e enramicina, de acordo com o Ministério da Agricultura (PALERMO, 2006).

A União Européia, em 1997, proibiu o uso de avoparcina e, em 1998, de bacitracina de zinco, espiramicina, virginamicina e tilosina (UTIYAMA, 2004). Os produtores europeus até dezembro de 2005 podiam recorrer a apenas quatro aditivos: monensina, salinomicina, avilamicina e flavomicina; os dois primeiros são ionóforos bastante utilizados como agentes anticoccidianos para aves, restando apenas os dois últimos como aditivos alimentares para frangos de corte e outras aves. Atualmente todos eles estão proibidos (PALERMO, 2006).

Neste contexto, aditivos de origem microbiana como probióticos tem merecido uma especial atenção como uma alternativa ao uso dos tradicionais antibióticos. A utilização de probióticos representa um avanço tecnológico, aplicando os efeitos benéficos propiciados pela natureza às criações comerciais.

2.3.2 Microflora intestinal

De acordo com SILVA e ALVES FILHO (2000a) a microbiota intestinal é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro.

As bactérias que colonizam o trato intestinal no início da vida do animal, tendem a persistir ao longo da vida da ave, passando a compor a microbiota intestinal. A formação desta microbiota se dá imediatamente após o nascimento das aves e aumenta durante as primeiras semanas de vida, até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbicas (FLEMMING, 2005b).

O recém-nascido adquire uma microflora intestinal que é característica de cada espécie. No estado selvagem, o animal obtém sua flora intestinal a partir do ambiente contaminado com bactérias da mãe. Esta microflora, uma vez estabilizada no intestino, auxilia o animal a resistir a infecções, particularmente do trato digestório (GHADBAN, 2002).

De acordo com LODDI (2001), as aves representam um excelente exemplo deste fenômeno, pois o ovo é retirado da mãe e eclodido em uma incubadora limpa, não havendo, portanto, o contato com a galinha. Assim, o pintinho recém nascido adquire parcialmente sua microflora através do ambiente do incubatório, enquanto que as aves silvestres obtêm as bactérias benéficas logo após o nascimento via bico, papo ou excremento das mães. Os pintainhos provenientes de incubadoras comerciais não têm esta oportunidade e ficam susceptíveis a todo tipo de contaminação microbiana, geralmente patogênica. Segundo MILES (1993), nas condições citadas acima, uma população bacteriana similar à do adulto está presente em duas semanas no intestino delgado e em cerca de 30 dias no ceco, em nível superior ao que ocorreria em condições naturais.

O estabelecimento da microbiota no trato intestinal da ave por meio de uma inoculação maciça de microorganismos é possível e quanto mais precoce for o fornecimento de aditivos alimentares microbianos, melhor será sua eficácia, sugerindo assim um fornecimento intra-ovo que possibilite a introdução de agentes na cavidade amniótica na fase pré-eclosão (MENTEN e PEDROSO, 2005).

A colonização da mucosa intestinal por grande e diversificado número de bactérias é normal no homem e animais, incluindo as aves. No hospedeiro, estas bactérias devem encontrar as condições propícias para a colonização e sua persistência, como temperatura, pH adequado e oferta de substratos (SANTOS e TURNES, 2005). Entre os principais gêneros de bactérias que são identificados na microbiota cecal das aves, observam-se invariavelmente a presença de *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Serratia*, *Veillonella*, *Streptococcus*, entre outros (SILVA e ALVES FILHO, 2000a). O número e composição destes microorganismos variam consideravelmente ao longo do trato gastrointestinal. No Inglúvio existe a predominância de *Lactobacilos*, que produzindo ácido láctico e acético reduzem o pH, impedindo o crescimento de bactérias. O pH no proventrículo e moela são extremamente baixos e poucas bactérias são capazes de tolerar este ambiente. No duodeno, o pH é próximo ao neutro e os microorganismos colonizam este segmento do intestino delgado, bem como o jejuno e o íleo (MACARI e FURLAN, 2005). A quantidade de *Lactobacillus* presente nos cecos é menor do que o presente no íleo, evidenciando que este compartimento pode abrigar potenciais patógenos da ave, como bactérias do gênero *Clostridium*. Por isso o ceco é reconhecido como o segmento de maior colonização de microorganismos, sendo que grande número de bactérias Gram positivas e negativas estão presentes neste local (MENTEN e PEDROSO, 2005).

As bactérias no trato gastrointestinal podem encontrar-se, tanto associadas intimamente ao epitélio, quanto livres na luz intestinal. As bactérias livres devem multiplicar-se rapidamente para compensar a eliminação pelo peristaltismo ou ainda agregarem-se às demais bactérias que se encontram aderidas na mucosa intestinal. Esta variada composição da microflora intestinal pode ser tanto benéfica quanto maléfica para o hospedeiro, dependendo da natureza e da quantidade de

microorganismos (GONZALES, 2004). Os efeitos maléficos são: diarreia, infecções, distúrbios hepáticos, carcinogênese, putrefação intestinal, redução da digestão e absorção de nutrientes. Já os benefícios estariam vinculados à inibição do crescimento de bactérias patogênicas, estímulos ao sistema imune, síntese de vitaminas, redução da produção de gases e melhor digestão e absorção dos nutrientes (FURLAN et al, 2004).

LODDI (2001) cita que diversos fatores podem afetar a estabilidade da população microbiana do trato gastrintestinal, entre eles a diversidade dos microorganismos, a qual aumenta com a idade, ou seja, o ecossistema de um animal adulto se apresenta mais variado do que de um recém-nascido. Devido a esta baixa diversidade de microorganismos intestinais, os animais jovens são mais suscetíveis a distúrbios entéricos, pois onde há grande número de espécies bacterianas em equilíbrio existe maior capacidade do ecossistema se opor as pequenas mudanças. A diversidade de nutrientes também influi no equilíbrio bacteriano, uma vez que cada microorganismo cresce melhor com determinadas fontes de nutrientes. Se um microorganismo patogênico se instalar, a competição pelo alimento provocará uma redução desta diversidade e conseqüentemente da estabilidade da microbiota intestinal. Os microorganismos se adaptam ao meio, competindo ou beneficiando-se deste. Entretanto, a microbiota normal apesar de competir pelos nutrientes do alimento, atua de forma que o animal tenha em contrapartida outros benefícios como: digestão de substratos não degradáveis pelo hospedeiro, resistência à invasão por patógenos, metabolização de toxinas, entre outros (GHADBAN, 2002).

O estresse também pode interferir na estabilidade normal da microbiota intestinal, visto que um animal estressado tem sua flora intestinal benéfica reduzida, devido, possivelmente, a uma queda no nível de substrato para seu crescimento. A quantidade de mucina, uma fonte de energia para as bactérias anaeróbicas, secretada no interior do trato gastrintestinal, pode ser diminuída ao se administrar corticosteróide aos animais e alguns pesquisadores associam um aumento na liberação de corticosteróide endógeno como uma resposta ao estresse. Se a tensão for muito grande e crônica pode resultar numa liberação maior de corticosteróide e uma diminuição na secreção de mucina. Com isto o número de bactérias anaeróbicas que utilizam este composto se reduz e conseqüentemente o número de

bactérias patogênicas aumenta gradualmente (GHADBAN, 2002). A diarreia, algumas vezes, pode ser uma expressão do estresse que o animal vem sendo submetido. Logo, fica evidente que o equilíbrio da microbiota intestinal, reflete diretamente em um bom estado de saúde do hospedeiro (GONZALES, 2004).

A proliferação dos organismos patogênicos leva a um espessamento da parede intestinal e a redução do tamanho das vilosidades, uma forma de defesa, com conseqüente redução da eficiência absorptiva intestinal que, na prática, resulta em piora na conversão alimentar e no ganho de peso dos animais (FURLAN et al, 2004).

Em animais adultos saudáveis, o equilíbrio dos microorganismos no trato intestinal auxilia no aumento da eficiência digestiva e aumenta a absorção de nutrientes, além de aumentar a resistência contra doenças infecciosas (FLEMMING, 2005b).

Aproximadamente 90% da flora intestinal é composta por bactérias facultativas produtoras de ácido lático (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* etc) e bactérias anaeróbicas estritas (*Bacteróides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*). Os 10% restantes consistem de *E. coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Blastomyces*, *Pseudomonas*, *proteus* e outros. Qualquer mudança nesta proporção acarreta um potencial baixa do desempenho produtivo e infecções intestinais (GHADBAN, 2002).

2.3.3 Composição e utilização dos probióticos

Os organismos mais comuns usados nas preparações probióticas são as bactérias produtoras de ácido lático. Elas são encontradas em grandes quantidades no intestino de animais saudáveis e não parece afetá-los de maneira adversa (GONZALES, 2004).

Os probióticos podem conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas. *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium* e especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão presentes em todas as misturas de culturas definidas (FLEMMING, 2005b). Quando as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e cultivadas e/ou liofilizadas, algumas das suas propriedades podem ser perdidas. Por outro lado, não se

conhece, ainda, nem a composição total, nem a perfeita combinação entre as que melhor estimulam as propriedades probióticas "in vivo". Estas são as razões pelas quais os produtos com culturas não definidas, ou fezes frescas, têm melhor ação probiótica do que as culturas definidas (GHADBAN, 2002).

Há probióticos com diferentes composições de microrganismos e, mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie, podem ter diferentes cepas (FURLAN et al, 2004). A eficácia do produto é estritamente dependente da quantidade e características das cepas do microrganismo utilizado na elaboração do produto a ser utilizado como aditivo alimentar. Portanto, é importante que se analisem os probióticos como produtos separados, da mesma maneira como é feita com os antibióticos (LODDI, 2001).

SILVA e ALVES FILHO (2000) citam que há necessidade que as bactérias sejam hospedeiro-específicas, a fim de que a máxima eficácia seja atingida, pois se fezes de eqüinos forem utilizadas como probióticos para prevenção de *salmonella* em aves seu efeito será ineficaz e o inverso também acontece e mesmo entre aves de espécies diferentes a proteção acaba sendo apenas parcial. De acordo com MENTEN e PEDROSO (2005), existe uma grande variedade de probióticos disponível no mercado nacional e internacional e dependendo do país, as regulamentações para a comercialização são mais ou menos rigorosas. Internacionalmente é estipulado que os produtos devem ter indicado no rótulo o número de microorganismos viáveis por grama, nome científico completo dos microorganismos que os compõem e sua vida de útil.

Os probióticos podem ser aplicados de várias formas, como: adicionados às rações; na água de bebida; pulverização sobre os animais; em cápsulas gelatinosas via intra-esofagiana; inoculação em ovos de aves embrionados e na cama usada de aves (PETRI, 2000). A via de administração dos probióticos pode determinar uma melhor ou pior capacidade de colonização intestinal pelas bactérias presentes no produto utilizado. A inoculação direta no esôfago/inglúvio (intra-esofagiana) é a mais eficiente, todavia, em se tratando da aplicação para um grande número de aves acaba sendo pouco indicado (LODDI, 2001). Já a aplicação de próbióticos *in ovo* tende a ser uma técnica aperfeiçoada ainda e em um futuro próximo será algo rotineiro na avicultura (SILVA e ALVES FILHO, 2000).

GHADBAN (2002) relata que a aplicação de spray de probiótico acompanhado da administração na água de bebida é um eficiente método para controlar a colonização por *salmonella* em aves.

2.3.4 Propriedades desejáveis de um probiótico

Um bom probiótico deve sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (ação da bile e dos sucos gástrico, pancreático e entérico) permanecendo no ecossistema intestinal; não ser tóxico nem patogênico para o homem e para animais, ser estável durante a estocagem e permanecer viável por longos períodos de tempo nas condições normais de estocagem, ter capacidade antagônica às bactérias intestinais indesejáveis e promover efeitos comprovadamente benéficos ao hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Ressalta-se, também, que deve ser um habitante normal do trato intestinal do hospedeiro em, para ser capaz de sobreviver, crescer e se fixar no intestino. Embora, exista a utilização comercial de probióticos com microorganismos que não tem a mesma capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, como o *Bacillus subtilis*, este atinge o interior do intestino com um maior número de microorganismos viáveis se comparado ao *Lactobacillus acidophilus*, pelo fato de estar na forma esporulada e, conseqüentemente, não ser destruído durante o processamento da ração (GONZALES, 2004).

Para TOURNUT (1998), algumas normas foram adotadas pela EXPERT COMMISSION on ANIMAL FEEDS para a avaliação da eficácia de um produto probiótico. Primeiramente, o probiótico é avaliado por checagem de suas características genéticas e, em seguida, são feitos ensaios em que o probiótico deve permanecer estável sob diversas condições, por no mínimo, um ano em condições de estoque para apresentação comercial, por dois meses no alimento comercializado sob a forma peletizada e por três meses quando submetido à temperatura de 80°C. Com a finalidade de garantir a eficiência do produto em questão, também é recomendado durante períodos experimentais à contagem de organismos viáveis na ração, no lúmen intestinal (no mínimo no íleo, ceco e cólon), e no trato gastrointestinal depois de cessada a administração do probiótico (GHADBAN, 2002).

O alvo do probiótico é reparar as deficiências na microflora e restaurar a resistência dos animais às doenças. Como tratamento, ele não introduz nenhuma substância estranha nos intestinos dos animais, nem leva risco de contaminar as carcaças ou introduzir substâncias perigosas na cadeia alimentar (SANTOS e TURNES, 2005).

2.3.5 Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão totalmente elucidados. Porém, especula-se que um ou mais processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição bacteriana intestinal (GHADBAN, 2002). Um dos mecanismos de ação dos probióticos parece ser através de uma competição física no trato digestivo (TOURNUT, 1998). Os microrganismos probióticos competem com os patógenos na ocupação dos sítios de aderência nas vilosidades intestinais, impedindo a livre fixação dos mesmos, protegendo as vilosidades e a superfície absorptiva de toxinas irritantes produzidas pelos microrganismos patogênicos, permitindo a regeneração da mucosa lesada (PETRI, 2000). Se as bactérias lácticas forem introduzidas no trato intestinal, na época em que o equilíbrio está favorável ao desenvolvimento das bactérias patogênicas (estresse, doenças, troca de alimentação, clima etc.) ou quando nenhuma ou baixo número de bactérias lácticas estão presentes (ao nascimento ou após tratamento com antimicrobianos), então distúrbios digestivos podem ser minimizados ou superados (MENTEN e PEDROSO, 2005).

De acordo com GHADBAN (2002) bactérias probióticas como *Bacillus subtilis* também podem suprimir a produção de amônia e assim melhorar a saúde e crescimento do animal, visto que a amônia pode causar danos nas células intestinais, diminuindo o rendimento do animal.

Os principais modos de ação descritos para os probióticos são: exclusão competitiva ou competição por sítios de ligação, produção de substâncias antibacterianas e enzimas, competição por nutrientes e estímulo ao sistema imune.

2.3.5.1 Exclusão competitiva

Esta teoria surgiu a partir do conceito de “competição por sítios de ligação”. (NURMI e RANTALA, 1973), para designar a inabilidade de uma população de microorganismos em se estabelecer no intestino devido à presença de uma outra população. Estes autores demonstraram que ao fornecer conteúdo intestinal diluído de aves adultas e saudáveis a pintinhos recém-nascidos, estes estavam prevenidos contra a contaminação de *Salmonella infantis*. Esta pesquisa foi a base para novos estudos utilizando o conceito de exclusão competitiva.

As bactérias probióticas ocupam sítios de ligação (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas (GHADBAN, 2002). O bloqueio dos sítios de ligação na mucosa entérica, pelas bactérias intestinais, pode reduzir a área de interação nos cecos pelas bactérias patogênicas. Assim, as bactérias patogênicas seriam excluídas por competição (PETRI, 2000). De acordo com LODDI (2001), as fimbrias são os elementos de aderência bacteriana mais conhecidos e estudados. Estas fimbrias são compostas por lectinas, que reconhecem oligossacarídeos específicos dos sítios de ligação da parede intestinal. A colonização varia com o tipo de bactéria e o tipo de hospedeiro. Algumas bactérias somente se aderem à superfície superior (glicocalix) dos enterócitos, enquanto que outras residem somente nas criptas onde são produzidas as novas células epiteliais que migram até as vilosidades. Algumas destas fimbrias podem ser bloqueadas pela manose (MACARI e FURLAN, 2005).

A aderência à mucosa intestinal parece, portanto, o mecanismo chave da colonização das bactérias patogênicas, e seus efeitos nocivos sobre a saúde intestinal (PETRI, 2000). Assim, processos que possam prevenir a aderência das bactérias são eficazes em reduzir a colonização por patógenos, nos segmentos do trato gastrointestinal, como promover a quebra dos mecanismos que sintetizam o glicocalix ou fimbria, principalmente pela inibição da polimerase bacteriana que estabelece os elos dos açúcares no polisacarídeo, desenvolver compostos que ocupam e bloqueia o loco ativo de ação da lectina, que liga os glicocalix da bactéria com o do enterócito e também estabelecer o bloqueio dos receptores nas células hospedeiras, evitando assim a ligação do glicocalix bacteriano com o glicocalix do enterócito (FURLAN et al, 2004).

Segundo PETRI (2000), além do efeito físico de barreira contra bactérias patogênicas as bactérias probióticas também exercem um efeito biológico, na medida em que promovem um ambiente de baixa tensão de oxigênio, desfavorecendo o crescimento de bactérias enteropatogênicas, principalmente as *salmonellas*. Favorecem também um efeito químico, pois bactérias probióticas produzem ácidos orgânicos como (lático e propiônico), os quais levam a uma redução do pH do ambiente intestinal, com uma conseqüente inibição de bactérias patogênicas (GHADBAN, 2002).

2.3.5.2 Produção de substâncias antibacterianas e enzimas

As bactérias da microbiota intestinal e/ou componentes dos probióticos podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio, que têm ação bacteriana especialmente em relação às bactérias patogênicas (PETRI, 2000). As bacteriocinas são substâncias protéicas e antibióticas de ação local, que inibem o crescimento de patógenos intestinais e que tem ausência de letalidade para as células produtoras (GHADBAN, 2002). As bactérias ácido lácticas produzem nisina, diplococcina, lactocidina, bulgaricina e reuterina. Estas substâncias apresentam atividade inibitória tanto para bactérias gram-negativas quanto para gram-positivas, como a *Salmonella* spp, *E.coli* e *Staphylococcus* spp (FERREIRA e ASTOLFI-FERREIRA, 2006).

As bactérias intestinais, utilizando-se de ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro (prebióticos), produzem alguns ácidos orgânicos, como o propiônico, o acético, o butírico e o lático, além do peróxido de hidrogênio, cujos espectros de ação incluem também a inibição do crescimento de bactérias patogênicas (FURLAN et al, 2004). Aparentemente, a ação bacteriostática dos ácidos graxos é dependente do pH, pois quanto maior a redução deste, maior a quantidade de ácido e efeito antibacteriano mais intenso. Não se deve descartar a idéia de que todas estas substâncias antibacterianas podem atuar em associação, não só entre si como fatores desencadeantes e processantes, mas também como bloqueio físico (PETRI, 2000).

As bactérias probióticas podem produzir, também, substâncias com capacidade de neutralizar enterotoxinas, as quais são produzidas por bactérias patogênicas (GHADBAN, 2002).

Algumas bactérias secretam enzimas como a *b-glucoronidase* e *hidrolases* de sais biliares que liberam compostos como ácidos biliares com ação inibitória sobre as outras bactérias (LODDI, 2001).

2.3.5.3 Competição por nutrientes

A competição por nutrientes ocorre entre o animal e a bactéria, porém ela também ocorre entre as bactérias intestinais por seus nutrientes específicos (PETRI, 2000). A escassez destes nutrientes disponíveis na luz intestinal que possam ser metabolizados pelas bactérias patogênicas é fator limitante de manutenção das mesmas neste ambiente (SILVA e FILHO, 2000). As bactérias dos probióticos se nutrem de ingredientes que foram parcialmente degradados pelas enzimas digestivas, ou que foram intencionalmente adicionados à dieta como prebióticos (LODDI, 2001).

2.3.5.4 Estímulo ao sistema Imune

As bactérias probióticas têm a capacidade de modulação de respostas imunes sistêmicas aumentando o número e a atividade de células fagocíticas do hospedeiro (FERREIRA e ASTOLFI-FERREIRA, 2006). Um animal não consegue sobreviver se não desenvolver uma microbiota intestinal normal. A maior parte deste conhecimento veio de experimentos com animais desprovidos e criados em condições de esterilidade, chamados de animais exênicos (FLEMMING, 2005b).

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como o *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon (FULLER e GIBSON, 1997). Entretanto, o verdadeiro mecanismo, pelos quais essas bactérias estimulam o sistema imune, ainda, permanece com muitos pontos a serem esclarecidos (FLEMMING, 2005b).

O trato intestinal das aves é o órgão de maior responsabilidade no desenvolvimento da imunidade geral inespecífica. Diferentemente de todas as outras espécies animais, as aves não apresentam linfonodos (TOURNUT, 1998). Seus órgãos linfóides, espalhados ao longo do trato intestinal, são as placas de Peyer, tonsilas cecais, inclusive a Bolsa de Fabricius que é uma invaginação da parte final do trato digestivo. Estes tecidos captam antígenos disponibilizados no trato digestivo que estimulam as células B, precursoras de IgA e células T, colaboradoras das placas de Peyer, para o desenvolvimento de imunidade geral e inespecífica. Através do estímulo imunológico da mucosa, há produção de anticorpos tipo IgA que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (LODDI, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL, DURAÇÃO E AVES EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado no galpão experimental do Departamento de Zootecnia da Fazenda Experimental Cangüiri pertencente ao Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no município de Pinhais – PR.

Foram utilizados 1.200 frangos de corte, machos, da linhagem comercial Ross, criados de 1 a 42 dias de idade.

3.2 INSTALAÇÕES E MANEJO

As aves foram alojadas em um galpão experimental de alvenaria constituído por um corredor central e dividido em boxes, os quais foram recobertos com cama de cepilho de madeira (cama de segundo lote com 10 cm de espessura), com comedouros e bebedouros do tipo pendular – durante os 4 dias iniciais foram utilizados bebedouros infantis - seguindo as normas tradicionais de manejo em avicultura de corte. Os bebedouros foram lavados diariamente e os comedouros mexidos três vezes por dia. Utilizou-se uma lotação de 10 aves por m². Para o aquecimento inicial dos pintainhos, que durou até 21 dias, foram utilizadas campânulas elétricas com lâmpadas de 250 W.

A mortalidade foi registrada diariamente com o respectivo peso das aves mortas.

3.3 DIETAS EXPERIMENTAIS

Utilizaram-se dietas isonutritivas, com ingredientes comumente empregados nas indústrias avícolas brasileiras (Tabela 1), fornecidas à vontade. As dietas foram isentas de antibióticos, exceto o tratamento considerado controle positivo (T3), no qual foram utilizadas Avilamicina (10ppm de 1 a 35 dias) + Monensina (100ppm de 1 a 21 dias) e Salinomicina (66ppm de 22 a 35 dias).

Tabela 1. Composição calculada das dietas

Ingredientes (%)	Dias		
	1-21	22-35	36-42
Milho	55,30	62,69	63,22
Soja integral	19,40	18,00	15,9
Farelo de soja 45	18,10	10,20	14,80
Farinha de carne	3,20	2,60	2,20
Oleo de aves	-	0,40	2,00
Farinha de visceras	1,50	1,90	-
Farinha de sangue	0,50	2,40	-
Calcário	0,65	0,45	0,70
NaCl	0,40	0,40	0,40
Premix mineral e vitamínico	0,40	0,40	0,40
Metionina hidroxí-analóga	0,32	0,24	0,22
L-Lysina (HCl)	0,16	0,26	0,10
Colina 75%	0,07	0,07	0,07
Nutrientes			
Proteína bruta (%)	22,00	20,00	18,18
Energia metabolizável kcal/kg	3.100	3.200	3.250
Cálcio (%)	1,00	0,87	0,77
Fósforo disponível (%)	0,45	0,41	0,36
Sódio (%)	0,21	0,22	0,20
Metionina (%)	0,62	0,51	0,48
Metionina+Cisteína (%)	0,98	0,88	0,79
Lisina (%)	1,29	1,14	1,03

¹ Fornecido por kg da dieta: Vit A 8.000 lu; Vit D3 2.400 IU; Vit E 16,65 mg; Vit K 1,5 mg; Vit B1 0,6 mg; Vit B2 2,36 mg; Vit B6 0,6 mg; Vit B12 1,320 mcg; biotina 0.15 mg; Colina 1.54 g; ácido pantotênico 9,32 mg; Niacina 30,12 mg; ácido fólico 1,42 mg; Se 0,65 mg; I 0,35 mg; Fe 57,72 mg; Cu 12,30 mg; Zn 141,48 mg; Mn 173,0 mg; K 7,88 g; ; S 0,72 g; Mg 0,90 g.

3.4 TRATAMENTOS

Os tratamentos utilizados foram:

T1 – Controle Negativo (dieta basal, sem antibióticos);

T2 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (8×10^5 UFCs/g de alimento);

T3 – Controle Positivo (avilamicina + coccidiano, de 1-35 dias de idade) e

T4 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (3×10^5 UFCs/g de alimento).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, distribuído em 4 tratamentos com 10 repetições. Os resultados observados para as variáveis estudadas foram submetidos à análise de variância, e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + E_{ij}$$

Onde,

Y_{ij} = valores observados submetidos aos efeitos dos tratamentos

μ = efeito da média

P_i = efeito da presença de promotor de eficiência alimentar

E_{ij} = erro aleatório associado à observação Y_{ij}

3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICROBIANA

Para determinação do *Bacillus subtilis* foi usado um método quantitativo, em que o resultado é expresso como UFC/g. As amostras são homogeneizadas com o

diluyente estéril e a partir deste uma nova diluição é preparada para cada amostra e tratada termicamente a 80⁰ C /10 minutos. Diluições decimais (diluyente Peptona de caseína, NaCl e Antiespumante) são preparadas a partir das amostras tratadas termicamente, espalhadas nas placas sobre o TBA agar (ágar base de sangue e tryptose) e incubadas.

3.7 ÍNDICES AVALIADOS

3.7.1 Ganho de peso (GP)

O ganho de peso das aves foi obtido pela diferença entre as pesagens das aves no início e final de cada fase de criação (1, 21, 35 e 42 dias de idade). O ganho de peso médio por fase foi obtido pela divisão entre o peso total das aves da repetição pelo número de aves vivas da respectiva repetição.

3.7.2 Consumo de ração (CR)

O consumo de ração foi obtido pela diferença entre a ração fornecida e a sobra de cada parcela. As pesagens das sobras de ração foram realizadas nas mesmas datas das pesagens das aves (1, 21, 35 e 42 dias). O consumo médio foi corrigido pela mortalidade ocorrida em cada fase de criação. Para tal, foi anotado o peso da ave e o dia em que ocorreu a mortalidade e calculado o número médio das aves vivas no final de cada fase da criação. O consumo médio de ração por cada fase de criação foi obtido pela relação entre consumo total de ração pelo número médio de aves vivas, corrigido para mortalidade.

3.7.3 Conversão alimentar (CA)

A conversão alimentar foi obtida pela relação entre o consumo total de ração pelo ganho de peso em cada unidade experimental. A conversão alimentar foi corrigida incluindo o peso das aves que morreram em cada fase da criação avaliada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo de ração

Os resultados para consumo de ração nas diferentes fases de criação, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Consumo de ração em gramas, de frangos alimentados com dietas contendo ou não aditivos alimentares.

TRATAMENTO	1-21 dias	1-35 dias	35-42 dias	1-42 dias
T1	1,240 a	3,014 a	1,397 ab	4,412 a
T2	1,185 ab	2,924 ab	1,393 ab	4,316 a
T3	1,109 b	2,795 b	1,306 b	4,102 b
T4	1,162 ab	2,930 ab	1,426 a	4,356 a
CV (%)	7,7049	5,8527	7,5019	4,9718
P	0,0086	0,0313	0,0527	0,0037

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste Tukey (5%)

T1 – Controle Negativo (dieta basal, sem aditivo);
 T2 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (8×10^5 CFUs/g de alimento);
 T3 – Controle Positivo (avilamicina + coccidiano, de 1-35 dias de idade);
 T4 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (3×10^5 CFUs/g de alimento).

Houve um aumento no consumo de ração ($p < 0,05$), das aves alimentadas com dietas isentas de aditivo alimentar, quando comparadas às aves alimentadas com dietas contendo antibiótico no período inicial de vida (1 até 21 dias). Entre os demais tratamentos não houve diferença para esta variável. No entanto, CORREA et al. (2003), avaliando o antibiótico bacitracina de zinco em comparação a um poliprobótico comercial, neste mesmo período de vida, observaram um maior consumo de ração para o tratamento contendo antibiótico e, conseqüentemente, a melhor conversão alimentar foi para o tratamento com poliprobótico. O consumo de ração, no período de 1 até 35 dias de idade, da mesma forma foi aumentado somente para dieta isenta de promotor, quando comparada à dieta com antibiótico. Já na fase final (35 – 42 dias), houve diferença somente no consumo de ração entre as aves alimentadas com dietas contendo antibiótico e o menor nível de *Bacillus*

subtilis. Avaliando-se o período total de criação, (1 a 42 dias) verifica-se aumento da ingestão de alimentos quando fornecida a dieta sem antibiótico.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de ocorrer uma ação seletiva por parte dos antibióticos, desfavorecendo o crescimento de bactérias que apenas competem pelo alimento com o hospedeiro e assim, conseqüentemente, favorecendo bactérias que sintetizam vitaminas (BUTOLO, 1998). Este mesmo autor também cita que estes compostos atuam aumentando a capacidade de absorção de nutrientes no trato gastrintestinal.

UTIYAMA (2004) complementa citando que os agentes antimicrobianos reduzem a irritação de mucosa e conseqüentemente aumentam a área de absorção de nutrientes, levando a crer que o animal necessita de uma menor quantidade de nutrientes para manutenção dos tecidos do trato gastrintestinal.

Estas ações dos antibióticos aliadas os mecanismos hipotalâmicos de regulação de ingestão de alimentos que atuam através de retroalimentação negativa, podem explicar os resultados obtidos para consumo de ração neste experimento.

Quando a ave ingere o alimento, produzem-se certos sinais no organismo que determinam à atividade do centro da saciedade que, por sua vez, suprime a ação do centro da fome, e o animal para de comer. Após um período de tempo, a intensidade desses sinais diminui, eliminando-se a ação inibidora do centro da saciedade sobre o centro da fome. Ao mesmo tempo, chegam ao hipotálamo estímulos de fome que ativam o respectivo centro, o qual inibe o centro da saciedade, e a ave é impelida a procurar e ingerir alimento (MACARI et al. 1994).

4.2 Ganho de peso

Os resultados para ganho de peso, nas diferentes fases de criação, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Ganho de peso, em gramas, de frangos alimentados com dietas contendo ou não aditivo alimentar

TRATAMENTO	1-21 dias	1-35 dias	35-42 dias	1-42 dias
T1	883	1,952	762,85	2,715
T2	886	1,950	757,66	2,708
T3	844	1,941	723,99	2,619
T4	859	1,895	779,17	2,720
CV (%)	6,5143	4,7081	7,644	4,1273
P	0,2943	0,4733	0,1855	0,1316

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste Tukey (5%)

T1 – Controle Negativo (dieta basal, sem aditivo);

T2 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (8×10^5 CFUs/g de alimento);

T3 – Controle Positivo (avilamicina + coccidiano, de 1-35 dias de idade);

T4 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (3×10^5 CFUs/g de alimento).

Na fase inicial de criação, até os 21 dias de idade, não foi observada diferença no ganho de peso das aves alimentadas com dietas contendo ou não aditivo alimentar ($P > 0,05$). Estes resultados discordam de BORATTO et al. (2004), que observaram um maior ganho de peso para as aves dos tratamentos com antibióticos e probióticos nesta mesma fase. Avaliando-se o efeito da adição tanto de antibiótico quanto de probiótico até os 35 dias ou no período total de criação, também não é observada diferença para ganho de peso.

Entretanto, SANTOSO (1995) e FRITTS et al. (2000), observaram um maior ganho de peso das aves do tratamento com *Bacillus subtilis* comparado ao tratamento controle na fase total de criação. FLEMMING (2005b) testando uma associação de probióticos (*Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) em comparação ao antibiótico avilamicina, não observou diferença para esta variável, entre os aditivos, porém ao compará-los-á com o tratamento sem promotor (controle) houve um maior ganho de peso daqueles ($P < 0,05$). Apesar do presente trabalho também

não ter apresentado resultados significativos para ganho de peso entre os diferentes tratamentos isso não reflete resultados negativos, uma vez que uma melhor conversão alimentar foi observada para o tratamento contendo *Bacillus subtilis* em seu maior nível em relação ao controle negativo.

4.3 Conversão alimentar

Os resultados para conversão alimentar, nas diferentes fases de criação, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Conversão alimentar, de frangos alimentados com dietas contendo ou não aditivos alimentares.

TRATAMENTO	1-21 dias	1-35 dias	35-42 dias	1-42 dias
T1	1,404 a	1,543 a	1,832	1,624 a
T2	1,338 bc	1,499 bc	1,838	1,594 b
T3	1,315 c	1,475 c	1,808	1,566 c
T4	1,352 b	1,509 b	1,831	1,601 b
CV (%)	3,1477	2,1276	2,6236	1,6983
P	0,0001	0,0001	0,5417	0,0001

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste Tukey (5%)

T1 – Controle Negativo (dieta basal, sem aditivo);

T2 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (8×10^5 CFUs/g de alimento);

T3 – Controle Positivo (avilamicina + coccidiano, de 1-35 dias de idade) e

T4 – Controle Negativo + *Bacillus subtilis* (3×10^5 CFUs/g de alimento).

Observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) para conversão alimentar no período de 1 a 21 e 1 a 35 dias de idade, sendo que a melhor conversão alimentar ocorreu para os frangos que se alimentaram da ração contendo antibiótico e Probiótico (*Bacillus subtilis* em seu maior nível), como aditivo alimentar. Considerando o período total de criação de 1 a 42 dias de idade, também foi observada uma melhor conversão alimentar para os animais que ingeriram ração com antibiótico, seguido dos frangos alimentados com rações adicionadas de *B. subtilis*. Resultados similares foram encontrados por ARAUJO et al. (2000), MAIORKA et al. (2001), BORATTO et al (2004), PELICANO et al. (2004), PELICIA et al. (2004) e FLEMMING et al. (2005).

DIBNER et al. (1996), citam que o desenvolvimento do trato gastrintestinal das aves pode ser afetado por aditivos presentes na dieta, incluindo antibióticos e bactérias probióticas, portanto, os efeitos encontrados neste experimento podem ser devido à estabilidade da microflora intestinal.

DIBNER e RICHARDS (2005) citam que o principal objetivo da utilização de antibióticos em rações, é de melhorar a conversão alimentar, fato observado neste ensaio.

Entretanto, no momento, o uso desses produtos é questionado devido à sua possível relação com a resistência aos antibióticos usados na terapia humana (PALERMO, 2006). Logo, a melhora no desempenho (conversão alimentar) das aves alimentadas com as dietas contendo o probiótico estudado mostra que a utilização destes produtos é uma alternativa viável ao uso de antibióticos como aditivos alimentares.

Os probióticos são desenvolvidos visando à estabilização da flora intestinal já nos primeiros dias de vida das aves, e assim, evita o aparecimento de problemas entéricos devido a microorganismos patogênicos (DAY, 1992; REIG e ANESTO, 2002).

A melhor conversão alimentar observada no tratamento contendo o *Bacillus subtilis* em comparação a dieta controle no período total de criação pode ser explicada de diversas maneiras. LA et al. (2001), citam o *Bacillus subtilis* é um agente de exclusão competitiva com capacidade de prevenir a colonização intestinal por *E. coli* em frangos. LA e WOODWARD (2003) também explanam que este microorganismo tem potencial capacidade de exclusão competitiva para evitar a colonização e persistência de *S. enteritidis* e *C. perfringens* em frangos e, conseqüentemente, estimulam a colonização intestinal por bactérias probióticas, as quais ocupam sítios de ligação (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas. O bloqueio dos sítios de ligação na mucosa entérica, pelas bactérias intestinais benéficas, pode reduzir a área de interação nos cecos pelas bactérias patogênicas (LA et al., 2001). PETRI (2000), também cita que além do efeito físico de barreira contra bactérias patogênicas, as bactérias probióticas exercem um efeito biológico, na medida em que promovem um ambiente de baixa tensão de oxigênio, desfavorecendo o crescimento de bactérias enteropatogênicas, principalmente as *salmonellas*. Este

mesmo autor discorre sobre o efeito químico proporcionado, pois bactérias probióticas produzindo ácidos orgânicos (lático e propiônico), que levam a uma redução do pH do ambiente intestinal, com conseqüente inibição de bactérias patogênicas. LODDI (2001) complementa citando que existe uma competição por nutrientes entre as bactérias patogênicas e probióticas. Logo, todos estes efeitos proporcionam um melhor equilíbrio da flora intestinal e, conseqüente, melhora na conversão alimentar e desempenho do animal, fatos estes que vem sendo observados em diversos trabalhos da literatura.

EDENS (2003), por exemplo, relata que a inclusão de probiótico, com a presença predominante de *Bacillus subtilis* não alterou ganho de peso de frangos de corte, aos 42 dias de idade, porém promoveu melhor conversão alimentar.

CORREA et al. (2003) em um experimento com frangos de corte testaram a eficiência de um poli - probiótico contendo *Bacillus subtilis* em comparação ao antibiótico Bacitracina de zinco. Eles observaram um menor consumo de ração com uma conseqüente conversão alimentar melhor com a ração contendo o probiótico na fase inicial de criação em relação ao antibiótico Bacitracina de zinco.

SILVA e FILHO (2000) avaliando uma ração contendo probiótico *Bacillus subtilis* e uma ração contendo antibiótico comercial não observaram diferença para consumo de ração, porém as aves que ingeriram rações com aditivos independentemente de serem antibióticos ou probióticos tiveram uma melhor conversão alimentar. Também ARAUJO et al. (2000) avaliando o uso de antibiótico e probiótico para frangos de corte no período de 24 a 41 dias de idade, observaram que não houve diferença estatística para ganho de peso e consumo de ração, todavia observaram uma melhor conversão alimentar para as aves que receberam ração contendo probiótico e antibiótico e assim concluíram que a associação dos dois aditivos alimentares foi mais benéfica para o desempenho das aves.

Vários patógenos como a *Escherichia coli*, *Campylobacter* e *Salmonella* têm sido implicados como redutores do crescimento de aves com pior conversão alimentar. Possíveis mecanismos envolvidos nesta redução são: produção de toxinas, utilização de nutrientes essenciais do hospedeiro e supressão de microorganismos que sintetizam vitaminas e outros compostos nutricionais.

A inclusão de organismos desejáveis (probióticos), suplementados na dieta, possibilita o rápido desenvolvimento de bactérias benéficas no trato digestório do

hospedeiro, melhorando o desempenho destes EDENS (2003). De acordo com GHADBAN (2002) bactérias probióticas como *Bacillus subtilis* também podem suprimir a produção de amônia e assim melhorar a saúde e crescimento do animal com uma melhor conversão alimentar, visto que a amônia pode causar danos nas células intestinais, diminuindo o rendimento do animal. Este mesmo autor relata que as bactérias probióticas podem produzir também substâncias com capacidade de neutralizar enterotoxinas.

Conseqüentemente existe uma melhora no ambiente intestinal para os processos de digestão e absorção de nutrientes, tornando-os mais eficientes, (PELICANO et al., 2004), o que pode explicar a melhora da conversão alimentar verificada no presente trabalho. No entanto, a eficiência dos probióticos vai depender das características quantitativas e qualitativas dos microorganismos empregados para este fim (TOURNUT, 1998), o que dificulta o estudo comparativo entre os diversos probióticos.

De acordo com GUILLOT (2000) para que um probiótico seja efetivo é necessário que proporcione um número mínimo de 10^6 UFC/g de conteúdo intestinal. Este número representa uma estimativa do tamanho da população bacteriana a ser alcançada para se obter um efeito benéfico.

Além da quantidade empregada outro fator que interfere na ação benéfica é a espécie a ser utilizada. Espécies de *Bacillus* não são normalmente encontrados entre a microflora do intestino, uma vez que não apresenta a capacidade de colonizar o trato intestinal, assim como ocorre com espécies de *Lactobacillus*, as quais são bactérias comumente encontradas aderidas a mucosa intestinal (GONZALES, 2004).

Porém pesquisas com probióticos a base de esporos de *Bacillus* adicionados às rações mostraram bons resultados (MAIORKA et al., 2001; PELICANO et al., 2004; PELICIA et al., 2004 e FLEMMING et al., 2005) assim como a melhor conversão alimentar observada no presente trabalho, pois estes microorganismos apesar de não colonizarem o trato têm a capacidade de aderirem às bactérias patogênicas e carregá-las nas fezes para o meio externo, além disso, o *Bacillus subtilis* é um probiótico que resiste aos processos de temperatura que a ração sofre como peletização, haja vista estar na forma de endósporos, um estágio de dormência da célula bacteriana, o que confere uma alta estabilidade ao produto, pois

os bacilos são resistentes ao calor úmido e seco, radiação ultravioleta, radiação gama, agentes oxidantes, químicos e pressurização a vácuo e hidrostática. Em temperatura de peletização de ração, não superior a 90 °C, não são destruídos. Também são resistentes à ação dos ácidos gástricos e do pH do meio (HOOGES, 2004).

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que o probiótico (*Bacillus Subtilis* – cepa DSM 17299), melhora a conversão alimentar em relação ao tratamento controle e pode conseqüentemente, ser usado como aditivo alimentar, em dietas de frangos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, L.F., JUNQUEIRA, O.M., ARAUJO, C.S.S., LAURENTZ, A.C., SAKOMURA, N.K., CASARTELLI, E.M. Antibiótico e probiótico para frangos de corte no período de 24 a 41 dias de idade. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, V.37, 2000, Viçosa. Anais, Viçosa: SBZ, 2000. p. 254.

ARESTRUP, F.M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. Antimicrob agents*, 1999 V.12, p. 279-285.

BERTECHINI, A.G.; HOSSAIN, S.M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Santos. Anais... Santos: APINCO, 1993. p.1.

BIOTECNAL. O fantástico mundo dos probióticos. Manual da equipe técnica da Biotecnal, 1999.

BORATTO, A J., LOPES, D. C., OLIVEIRA, R. F. M. Use of antibiotic, probiotic and homeopathy, inoculated or not with *Escherichia coli*, for broilers reared under comfort environment. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Nov./Dec. 2004, vol.33, no.6, p.1477-1485.

BUTOLO, J.E. Agentes antimicrobianos em rações de aves e suínos. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. In: Simpósio sobre Aditivos na produção de ruminantes e não-ruminantes, Botucatu, 1998, anais. Botucatu: CBNA. 1998. p. 237-255.

BUTOLO, J. E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. IN: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal, Piracicaba, 1999, Anais. Piracicaba: CBNA. 1999. p. 85-98.

BUTOLO, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. Ed. OESP. Campinas, 2002. p. 350-370.

CHAIRMAN, C.N., WEBB, K.E., MCELROY, A. Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. Thesis of Master. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute. P. 9-16. Virginia, 2004.

CHANG, Y.H. Prevalence of salmonella spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. Journal of Food Protection. V.63, n.5, p. 655-658, 2000.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. Microingredientes: Microingredientes de alimentação animal. Brasília: CBNA; Sindirações. 2004. 45p.

CORREA, G.S.S., GOMES, A.V.C., CORREA, A.B. et al. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass yield of broilers. Arquivo. Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia., Aug. 2003, vol.55, no.4, p.467-473.

DAY, C.A. Competitive Exclusion in Poultry: A Review. Worcestershire: Life care products Ltd, 18p, 1992.

DIBNER, J.J., KITCHEL, C.A., ATWELL, M.L., IVEY, E.J. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. Journal Applied Poultry Research, Champaign, n.5, p. 70-77, 1996.

DIBNER, J.J., RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode action. Poultry Science v.84: 634-643, 2005.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: Probiotics. Brazilian Journal of Poultry Science, Campinas, V.5, n.2, p.75-97, 2003.

ESTRADA, A. Administration bifidobacterium bifidum to chicken broilers reduces the number of carcass condemnations for cellulitis at the abattoir. Journal of Applied Poultry research, v.10, n.4, p. 329-334, 2001.

FERREIRA, A.P., ASTOLFI-FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, 2006, Anais. Chapecó, 2006. p. 56-66.

FLEMMING, J.S., FREITAS, R.J.S., Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus leicheniformes* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Archives of Veterinary Science* V.10, n.2, p.41-47, 2005a.

FLEMMING, J.S. Utilização de leveduras, probióticos e mananoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frangos de corte. Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em tecnologia de alimentos. Curitiba-PR, p.50-57, 2005b.

FRITTS, C.A., KERSEY, J.H., MOTI, M.A., KROGER, E.C., YAN, F., SI, J., JIANG, Q., CAMPOS, M.M., WALDROUP, A.L., WALDROUP, P.W. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *Journal of applied Poultry Research* 2000; 9(2):149-155.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, New York, V.66, p. 356-378, 1989.

FULLER, R., GIBSON, G.R. Modification of the intestinal flora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian J. Gastroenterol.* V.32, p. 28–31. 1997.

FURLAN, R.L., MACARI, M., LUQUETTI, B.C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. 5º Simpósio Técnico de Incubação, matrizes de corte e nutrição. Balneário Camboriú, SC. 2004.

GHADBAN, G.S. Probiotics in Broiler production – a review. *Arch. Geflugelk.* V.66, n.2, p. 49-58, 2002.

GIBSON, G.R., ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, V.125, p. 1401-1412. 1995.

GONZALES, E. Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares. Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. Jaboticabal, 2004.

GUILLOT, J.F. The pros and cons of probiotics – Make probiotics work for poultry. *World Poultry*, v.16, n.7, p.18-21, 2000.

HOOGES, D. *Bacillus* spore may enhance broiler performance. *Feedstuffs*, v.75, n.3, p.1-5, 2004.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N. et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, v.77, p.1259-1265, 1998.

KANASHIRO, A.M.I., BOTTINO, J.A., FERREIRA, F. CASTRO, A.G.M., FERREIRA, A.J.P., Influencia da administração continua de probiótico a frangos de corte sobre atividades enzimáticas séricas e concentração de colesterol serico. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, V. 68, n.2, P. 11-17. 2001.

LA, R.M., CASULA, G., CUTTING, S.M., WOODWARD, M.J. *Bacillus subtilis* competitively exclude *Escherichia coli* in poultry. *Vet Microbial*. V. 79. p. 133-142. 2001.

LA, R.M., WOODWARD, M.J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet Microbiol*. V.94 p. 245-256. 2003.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: A visão da indústria e recentes avanços. Conferencia APINCO, Santos, 2005. Anais, Santos, FACTA, 2005. p. 21-35.

LODDI, M.M., GONZALES, E., TAKITA, T.S., MENDES, A.A., ROÇA, R.O. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. Revista Brasileira de Zootecnia, V.29, n.4. p.1124-1131. 2000.

LODDI, M.M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. Revista CFMV-Suplemento Técnico nº23 mai/jun/jul/ago. 2001.

MACARI, M., FURLAN, R, L., GONZALES, E. Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal – UNESP. 1994.

MACARI, M. FURLAN, R.L. Probióticos. Conferencia APINCO, Santos, 2005. Anais, Santos, FACTA, 2005. p. 53-68.

MAHDAVI, A. H., RAHMANI, H.R., POURREZA, J. et al. Eprobiotic supplementes on Egg quality and laying hen's performance. International Journal of Poultry science 4 (7) p. 488-492. 2005.

MAIORKA, A, SANTIN, E, SUGETA, SM et al. Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. Revista Brasileira de Ciência Avícola, jan./abr. 2001, vol.3, no.1, p.75-82.

MENTEN, J.F.M., PEDROSO, A.A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. Conferencia APINCO, Santos, 2005. Anais, Santos, FACTA, 2005. p. 41-53.

MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: Natural ways to prevent colonization by patogens. In: Biotechnology in the feed industry of annual symposium, 9., 1993, London. Proceeding. London: Nottingham University press. p.133-150. 1993.

NURMI, E., RANTALA, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. Nature, v.241, p.210-211, 1973.

PALERMO, J, N. Uso de medicamentos veterinários: Impactos na moderna avicultura. . In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, 2006, Anais. Chapecó, 2006. p. 70-78.

PELICANO, ERL, SOUZA, PA, SOUZA, HBA et al. Performance of broilers fed diets containing natural growth promoters. Revista Brasileira de Ciência Avícola, Outubro./Dezembro. 2004, vol.6, no.4, p.231-236. 2004.

PELÍCIA, K., MENDES, A.A., SALDANHA, E.S.P.B., PIZZOLANTE, C.C., TAKAHASHI, S.E., MOREIRA, J., GARCIA, R.G., QUINTEIRO, R.R., PAZ, I.C.L.A., KOMIYAMA, C.M. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens.v.6:163-169, 2004.

PETRI, R., Uso de exclusão competitiva na avicultura no Brasil. II Simpósio de sanidade avícola, setembro de 2000. Santa Maria-RS, 2000.

PEZZOTTI, G. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejune* and *campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. International Journal of food microbiology, v.82, n.3. p. 281-287, 2003.

REIG, A.L.C., ANESTO, J.B. Prebióticos y probióticos una relación benefiosa. Revista Cubana de Alimentación e nutrición, Havana, n.16, p. 63-68, 2002.

REYES, H.S.R. Efectos de la Aplicacion de bacterias lacticas y acido lactico en la ganancia de peso y mortalidad en pollos. Revista Científica. Facultad de Ciencias veterinarias, Zulia, v.10, n.4, p. 310-314, 2000.

SANTOS, J.R.G., TURNES, C.G. Probióticos em Avicultura. Ciência rural, Santa Maria, v.35, n.3, p.741-747, 2005.

SANTOSO, U. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. British Journal of Nutrition, V.74, n.4, p.523-529. 1995.

SCHWARZ, S., KEHRENBURG, C., WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. Antimicrob Agents* 2001, V. 17. p. 431-437.

SILVA, E.N., ALVES FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. II Simpósio de Sanidade Avícola, Santa Maria, RS. 2000a.

SILVA, E.N., TEIXEIRA, A.S., BERTECHINI, A.G., FERREIRA, C.L.L., VENTURA, B. G., Desempenho de frangos de corte alimentados com rações contendo probióticos, antibióticos e duas fontes de fósforo. *Revista Ciência Agrotecnica*, Lavras, V.24, p. 225-232. 2000b.

TOURNUT, J.R. Probiotics. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. *Anais... Botucatu: SBZ*, 1998, p.179-99.

UTIYAMA, C. E. Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém-desmamados. Tese de doutorado apresentada a escola superior de agricultura Luiz de queiroz, Piracicaba-SP, 2004.

WOLKE, LF.; FLEMING, J.S.; MIRA, R.T. et al. Utilização do probiótico *Bacillus natto* como promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza. *Anais... Fortaleza: SBZ*, 1996. p.36-38.

