

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA– PPGZOO**

**PATRICK IURY ROIESKI**

**PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUAS COMBINAÇÕES  
SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR  
*Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC)**

**CHAPECÓ**

**2022**

**PATRICK IURY ROIESKI**

**PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUAS COMBINAÇÕES  
SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR  
*Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientador: Prof. Dr. Marcel Manente Boiago

**CHAPECÓ**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Iury Roieski, Patrick  
PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E  
SUAS COMBINAÇÕES SOBRE O DESEMPENHO DE  
FRANGOS DE CÔRTE DESAFIADOS POR *Escherichia coli*  
PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) / Patrick Iury Roieski. --  
2022.  
50 p.

Orientador: Marcel Manente Boiago  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2022.

1. Antimicrobiano. 2. Exclusão competitiva. 3.  
Lactobacillus. 4. Mananoligossacarídeos. I. Manente Boiago,  
Marcel. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro  
de Educação Superior do Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

**PATRICK IURY ROIESKI**

**PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUAS COMBINAÇÕES  
SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR  
*Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientador: Prof. Dr. Marcel Manente Boiago

**BANCA EXAMINADORA**

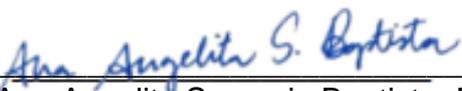
Membros:



Marcel Manente Boiago, Dr  
UDESC Oeste



Denise Nunes Araújo, Dr<sup>a</sup>  
UDESC Oeste



Ana Angelita Sampaio Baptista, Dr<sup>a</sup>  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Chapecó, 01 de agosto de 2022.

Por aqueles que sempre estiveram  
comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Altemiro e Idene, que apesar de todas as dificuldades enfrentadas durante esse período, nunca deixaram de trabalhar diariamente e prestar o auxílio necessário, além de todo incentivo que foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Agradeço a minha namorada Alana, por todo amor, respeito, carinho, atenção e resiliência compartilhado comigo nesses anos.

Aos amigos e colegas de curso, que sempre estiveram comigo durante toda essa caminhada, acompanharam-me em momentos bons, ruins, difíceis e alegres. Ao Grupo de Estudo em Avicultura – GEAVI, o qual tive a oportunidade de fazer parte durante todo período da pós-graduação.

Agradeço a Universidade do Estado de Santa Catarina por ser minha casa na formação acadêmica, por todo aprendizado proporcionado durante a fase da graduação e pós-graduação, sem dúvidas foi a minha melhor escolha.

Agradeço também a Vetanco do Brasil e seus colaboradores, pela concessão de produtos, recursos financeiros e pela excelente parceria gerada durante essa etapa tão importante.

Por fim, ao meu orientador e professor Dr. Marcel Manente Boiago, por sua exemplar conduta pessoal e profissional, que durante este período me permitiu conhecer, desenvolver e aperfeiçoar diversas atividades no meio acadêmico e exercer de fato a profissão de Zootecnista.

Encerro esse ciclo com muita gratidão por tudo que vivi e tenho a certeza de que o processo foi válido e gerará frutos. Sem mais delongas, com muito carinho afirmo em dizer a vocês meus caros: Eu os amo!

“Suas circunstâncias atuais não determinam onde você pode ir, elas apenas determinam onde você começa.”

(Nido Qubein)

## RESUMO

Promotores de crescimento com base em antibióticos possuem um longo e vasto histórico de uso na indústria avícola nacional e mundial. O uso dessas substâncias tem relação direta com as medidas de biossegurança dos lotes, com o propósito de elevar as variáveis de produção e atenuar o desenvolvimento de enfermidades, especialmente as bacterianas. No entanto, devido a seleção de microrganismos resistentes e a pressão dos mercados consumidores, o uso desses agentes sofreu redução e até mesmo, erradicação em alguns países. Baseado nisso, novas alternativas foram requeridas, entre elas, destacam-se os prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar o uso de produtos comerciais compostos por prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos como aditivos alimentares e seus efeitos sobre as variáveis de desempenho e microbiológicas de frangos de corte desafiados *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC). Foram alojados 480 pintainhos machos divididos em 6 tratamentos com 4 repetições com 16 animais cada. Todos os animais receberam dieta basal, sendo os tratamentos divididos pelos aditivos presentes na ração: (T1) Controle positivo (CP) - ração basal + inoculação, sem nenhum aditivo; (T2) Controle negativo (CN) - ração basal sem aditivo e sem inoculação; (T3) Tratamento com antibiótico (ATB) – aves inoculadas + ração basal com promotor de crescimento antibiótico; (T4) Tratamento com probiótico (PRO) - aves inoculadas + ração basal com produto probiótico; (T5) Tratamento com prebiótico e ácidos orgânicos (PRE+AO) - aves inoculadas + ração basal com produto composto por probiótico e ácidos orgânicos; (T6) Tratamento com probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos (PRO+PRE+AO) - aves inoculadas + ração basal com produtos compostos por probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos. Os animais foram desafiados com  $1,24 \times 10^7$  UFC/mL aos 14 dias de vida. As aves foram avaliadas quanto ao seu desempenho produtivo (índice de eficiência produtiva, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade), quantificação de *E.coli* nas excretas e translocação bacteriana no fígado. O impacto gerado pela contaminação das aves com a APEC foi mais significativo até os 35 dias de idade nos parâmetros produtivos, sem influenciar a viabilidade do lote. Não foi observada a expressão de doença clínica e mortalidade no lote. O uso do antibiótico (Enramicina 8%) e dos produtos compostos por probióticos e prebióticos + ácidos orgânicos proporcionou maior ganho de peso das aves nos períodos avaliados, entretanto não afetou a

contagem e a presença de *Enterobacterae* totais nas fezes e no fígado, respectivamente. A combinação dos produtos à base de probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos ocasionou piora da conversão alimentar e do ganho de peso das aves.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano; Exclusão competitiva; Lactobacillus; Mananoligossacarídeos.

## ABSTRACT

Antibiotic-based growth promoters have a long and extensive history of use in the national and global poultry industry. The use of these substances is directly related to the biosecurity measures of the lots, with the purpose of increasing production variables and attenuating the development of diseases, especially bacterial ones. However, due to the induction of resistance of microorganisms followed by pressure from consumer markets, the use of these agents has been reduced and even eradicated in some countries. Based on this, new alternatives were required, among them, the use of substances based on prebiotics, probiotics and organic acids stands out. Therefore, the objective of this work was to evaluate the use of commercial products composed of prebiotics, probiotics and organic acids as food additives and their effects on the performance and microbiological variables of broilers challenged by a known strain of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). To carry out this experiment, 480 male broiler chicks were divided into 6 treatments with 4 replications with 16 animals each. All animals received a basal diet and the treatments were divided into six groups: Positive control (PC) - basal ration + inoculation, without any additive; Negative control (NC) - basal diet without additive and without inoculation; Antibiotic treatment (ATB) – inoculated birds + basal feed with antibiotic growth promoter; Probiotic treatment (PRO) - inoculated birds + basal diet with probiotic product; Treatment with prebiotics and organic acids (PRE+AO) - inoculated birds + basal ration with a product composed of probiotics and organic acids; Treatment with probiotics, prebiotics and organic acids (PRO+PRE+AO) - inoculated birds + basal feed with products composed of probiotics, prebiotics and organic acids. The birds were evaluated for their productive performance (productive efficiency index, weight gain, feed intake, feed conversion and viability), quantification of *E. coli* in the excreta and bacterial translocation in the liver. The impact generated by the contamination of birds with APEC was more significant up to 35 days of age on production parameters, without influencing the viability of the flock. The use of antibiotics and products composed of probiotics and prebiotics + organic acids provided greater weight gain of the birds in the evaluated periods, however, it did not affect the count and presence of *E. coli* in feces and liver, respectively. The combination of products based on probiotics, prebiotics and organic acids caused a worsening of feed conversion and weight gain of the birds.

**Keywords:** Antimicrobial; Competitive exclusion; Lactobacillus; Mannanooligosaccharides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos ácidos orgânicos de acordo com a cadeia carbônica .....	21
Figura 2 - Índice de eficiência produtiva das aves submetidas aos diferentes tratamentos.....	36
Figura 3 – Ganho de peso médio diário das aves submetidas aos diferentes tratamentos.....	37
Figura 4 - Médias obtidas através da contagem de unidade formadora de colônia (UFC) de Enterobactereacea total nas fezes dos animais no período de 42 dias de vida.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de substâncias proibidas de acordo com a legislação vigente em âmbito nacional (BRASIL).....	18
Tabela 2 – Mecanismo de ação de alguns antibióticos. ....	19
Tabela 3 – Lista de ácidos orgânicos, conforme seu pKa de dissociação. ....	22
Tabela 4 – Composição percentual e nutricional das dietas utilizadas nas diferentes fases de criação.....	33
Tabela 5 - Médias obtidas para consumo de ração (CR, kg), ganho de peso (GP, kg), conversão alimentar (CA) e viabilidade (VIAB, %) das aves submetidas aos diferentes tratamentos nos períodos de 01 a 21, 01 a 35 e 01 a 42 dias de vida.....	35
Tabela 6 - Presença ou ausência de Escherichia coli no fígado. ....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
ANOVA	Análise de variância
APEC	Escherichia coli patogênica aviária
AO	Ácido orgânico
ATB	Antibiótico
CA	Conversão alimentar
CEUA	Comitê de ética e uso de animais
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CR	Consumo de ração
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FOS	Fruto – oligossacarídeos
GOS	Galacto – oligossacarídeos
GP	Ganho de peso
INOC	Inoculação
MOS	Manano – oligossacarídeos
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potencial hidrogeniôco
pKa	Constante de dissociação
PRE	Prebiótico
PRO	Probiótico
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade formadora de colônia
VIAB	Viabilidade

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1	PROMOTORES DE CRESCIMENTO .....	16
2.1.1	<b>Ácidos orgânicos</b> .....	20
2.1.2	<b>Colibacilose</b> .....	23
2.1.3	<b>Prebióticos</b> .....	25
2.1.4	<b>Probióticos</b> .....	27
3	<b>ARTIGO 1: PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUAS COMBINAÇÕES SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGÊNICA PARA AVES</b> .....	29
3.1	INTRODUÇÃO .....	29
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.2.1	<b>Ensaio piloto</b> .....	30
3.2.2	<b>Preparo do inóculo para o experimento</b> .....	31
3.2.3	<b>Desafio</b> .....	31
3.2.4	<b>Produtos utilizados</b> .....	31
3.2.5	<b>Animais, instalações e alimentação</b> .....	32
3.2.6	<b>Variáveis de desempenho</b> .....	33
3.2.7	<b>Quantificação de <i>Enterobactereacea</i> nas excretas e avaliação de translocação bacteriana para o fígado</b> .....	34
3.2.8	<b>Análise estatística</b> .....	34
3.3	RESULTADOS .....	35
3.4	DISCUSSÃO .....	38
3.5	CONCLUSÃO .....	41
4	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	42
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
	<b>COMPROVANTE CEUA</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimento cresceu substancialmente com o passar dos anos, e para sustentar a necessidade da população humana, a produção global precisa aumentar (AROEIRA et al., 2021). Em consonância com o apelo nacional e internacional por alimentos, a indústria avícola caracteriza-se como uma fonte de proteínas de alta qualidade (RAZA; BASHIR; TABASSUM, 2019). De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2022) o Brasil ocupa a terceira posição na produção mundial de carne de frango e a primeira no *ranking* global de exportação.

No entanto, para que o volume solicitado seja de fato atendido, é necessário que o processo siga em constante ascensão. Sem dúvidas, a adequação de fatores relacionados a nutrição, sanidade e bem-estar dos animais, colaboraram para o aumento do potencial produtivo e a expansão de novos mercados no exterior (OLADOKUN; ADEWOLE, 2020). Visando atender as exigências nutricionais e elevar índices produtivos, são utilizados os promotores de crescimento, aditivos introduzidos na alimentação com a intenção de melhorar as variáveis de ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar (TOLDRA; REIG, 2016).

O uso dos promotores de crescimento consiste em fornecer aos animais dosagens menores que as terapêuticas, cujo propósito é profilático, e visa atenuar a ocorrência de enfermidades, especialmente as bacterianas (FASINA et al., 2016). Um clássico exemplo é a colibacilose, por se tratar de uma doença causada pela bactéria *Escherichia coli* e possuir associação com a redução de índices produtivos devido a sua ação deletéria, à tornam hoje, um problema sanitário de extrema relevância em toda cadeia avícola nacional e mundial (SONG et al., 2020). Haja visto que, esses patógenos por vezes, além das perdas produtivas, são caracterizados como multiresistentes e inibem as ações dos medicamentos de forma gradual, apresentando risco aos consumidores através da recepção de genes com relativa resistência dos antibióticos para as outras bactérias (NHUNG; CHANSIRIPORNCHAI; CARRIQUE-MAS, 2017).

Conforme o exposto, a resistência de bactérias a alguns princípios ativos e as limitações impostas quanto ao uso desses medicamentos por leis

específicas abrem lacunas para o uso de aditivos naturais. Uma possibilidade em ascensão na área dos melhoradores de desempenho são os produtos alternativos com base em prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos (AMIRI et al., 2020). Esses compostos apresentam atividade antimicrobiana e otimizam o controle de determinadas enfermidades, o que os tornam uma excelente oportunidade para benefício da saúde intestinal e do sistema como um todo (GALLI et al., 2021).

Diante desse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o uso de produtos comerciais compostos por prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos como aditivos alimentares e seus efeitos sobre as variáveis de desempenho e microbiológicas de frangos de corte desafiados *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Na área de produção animal, o uso generalizado de antimicrobianos se deve não apenas como agentes terapêuticos, mas também como promotores de crescimento, agentes metafiláticos e profiláticos (GAMBI et al., 2022). O uso de promotores de crescimento com base em antibióticos elevou a eficiência produtiva na produção avícola por anos, porém, devido a prática muitas vezes inconsciente do uso, esses compostos tornaram-se uma preocupação para saúde humana e animal, especialmente, no que se referem a alteração do potencial de resistência antimicrobiana (KIM; MORISHITA; DONG, 2021).

Na esperança de reduzir o aumento de infecções causadas por patógenos resistentes, a pressão pública influenciou o setor agrícola, incluindo a indústria avícola, para limitar ou erradicar de vez, o uso cotidiano de antimicrobianos nos sistemas de produção animal (BAILEY et al., 2019). Baseado nisso, a pressão para reduzir o uso desses fármacos como promotores de crescimento nas atividades pecuárias é evidente, uma vez que inúmeros países estão aderindo às restrições do uso dessas substâncias (MARIA CARDINAL et al., 2019).

No entanto, essa tarefa não é simples, visto que, esses compostos apresentam um longo e vasto histórico de uso. A utilização de promotores de crescimento com base em antibióticos tem sido empregada nas atividades pecuárias em diversos países desde 1950 (DIBNER; RICHARDS, 2005). O primeiro registro de estudo é de 1947, onde verificou-se que os antibióticos promoveram melhores resultados no crescimento e desempenho de galinhas alimentadas com produtos fermentados a base de tetraciclina (GONZALEZ RONQUILLO; ANGELES HERNANDEZ, 2017). A partir disso, o uso de antibióticos em baixas dosagens como promotores de crescimento se tornou comum, de tal forma que em 1951 o Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos aprovou o seu uso na alimentação animal sem prescrição veterinária (GONZALES; MELLO; CAFÉ, 2012). Através desta constatação, seguido do rápido aumento da população mundial e a consequente intensificação da produção vegetal e animal, a utilização de antibióticos

expandiu-se para diversas espécies animais produtoras de alimentos (GAMBOA-CRUZ et al., 2021).

No entanto, nos dias de hoje o cenário é diferente. A Suécia foi o primeiro país a realizar a alteração das leis de uso de antibióticos, e em 2006, a União Europeia (UE) impôs a proibição na utilização destes compostos como promotores de crescimento na alimentação e na água de bebida dos animais (EUROPEAN UNION, 2003). Com o mesmo propósito, em 2017 os Estados Unidos através da FDA executaram uma manobra semelhante, porém, se restringindo apenas a retirada dos antimicrobianos de importância humana (FDA, 2013). De forma mais recente, a China, desde 1º de julho de 2020 restringiu o uso desses compostos na alimentação animal, como medida de erradicação do uso dessas substâncias (ZHANG et al., 2021).

Apesar dessa intensificação, rações suplementadas com antibióticos ainda podem ser adquiridas com facilidade e sem prescrição medico-veterinária em alguns dos principais países produtores de alimentos de origem animal no mundo (GAMBOA-CRUZ et al., 2021). Como consequência, a prática desse comércio expõem as bactérias a doses não letais de antibióticos, favorecendo a seleção de cepas patogênicas resistentes (BEN LAGHA et al., 2017). Todavia, além de causar impactos econômicos na produção animal, elevam-se as preocupações de saúde pública, uma vez que, comprovou-se que o uso contínuo de antimicrobianos leva a formação de bactérias com alta resistência, potencializando os níveis de dificuldade no tratamento de enfermidades em seres humanos (MUAZ et al., 2018).

Com o objetivo de que esses acontecimentos não venham a ocorrer e atendendo exigências de alguns mercados internacionais, o Brasil adequou-se ao sistema e passou a restringir o uso de agentes antimicrobianos que representam risco a saúde pública (*Tabela 1*).

*Tabela 1 - Lista de substâncias proibidas de acordo com a legislação vigente em âmbito nacional (BRASIL).*

<b>SUBSTÂNCIA</b>	<b>LEGISLAÇÃO</b>
Organoclorados	Portarias nº 329/1985 e 191/1986
Avoparcina	Ofício Circular DFPA nº 47/1998
Arsenicais e antimoniais	Portaria nº 31, de 29 janeiro de 2002
Cloranfenicol nitrofuranos	Instrução Normativa MAPA nº 09, de 27 de junho de 2003
Tireostáticos, androgênicos, estrogênicos ou gestagênicos, substâncias $\beta$ -agonistas	Instrução Normativa MAPA nº 17, de 18 junho de 2004
Olaquinox	Instrução Normativa SARC/MAPA nº 11, de 24 novembro de 2004
Carbadox	Instrução Normativa SDA/MAPA nº 35, de 14 novembro de 2005
Violeta de Genciana	Instrução Normativa nº 34, de 13 de setembro de 2007
Anfencóis, tetraciclina, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas	Instrução Normativa MAPA nº 26, 9/07/2009
Substâncias naturais ou artificiais, com atividade anabolizante hormonal em bovinos de abate	Instrução Normativa MAPA nº 55, de 1 de dezembro de 2011
Espiramicina e eritromicina	Instrução Normativa MAPA nº 14, de 17 de maio 2012
$\beta$ -agonista em bovinos	Ato nº 01 de 01 de novembro de 2012
Colistina (Como aditivo melhorador de desempenho)	Instrução Normativa MAPA nº 45, de 22 de novembro de 2016
Tilosina, lincomicina e tiamulina (Como aditivo melhorador de desempenho)	Instrução Normativa SDA/MAPA nº 1, de 13 de janeiro de 2020

Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento (MAPA, 2022).

Os antibióticos classificam-se como compostos naturais ou sintéticos, capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. São divididos em dois grupos, os bactericidas, que fazem o controle das bactérias de forma imediata e irreversível, e os bacteriostáticos, que promovem a inibição do crescimento microbiano pelo período em que a droga é ministrada (WALSH, 2003).

Embora os efeitos de doses subterapêuticas de antibióticos na composição e diversidade do microbioma intestinal das aves tenham sido extensivamente estudados, ainda, relativamente não se tem uma previsão concreta do impacto que os níveis terapêuticos de antibióticos causam na dinâmica total do trato gastrointestinal dos animais (KAIRMI et al., 2022). Uma vez que, a conexão da composição microbiana sofre alterações constantes ao longo da vida da ave diante dos parâmetros de desempenho (DITTOE; OLSON; RICKE, 2022).

Efeitos da melhoria do desempenho zootécnico decorrem da ação dessas substâncias no trato digestório sobre a microbiota intestinal, causando diminuição da competição por nutrientes e redução da produção de metabólitos que deprimem o crescimento dos animais (GONZALES; MELLO; CAFÉ, 2012). Basicamente, essas moléculas antimicrobianas combinam-se com componentes de membrana e/ou citoplasmáticos dos microrganismos, alterando suas funções celulares, podendo levar à morte celular ou depleção do metabolismo (NORDSTRÖM et al., 2018). De acordo com Ahiwe e colaboradores (AHIWE et al., 2021) o modo de ação dos antibióticos como promotores de crescimento, bem como, o controle bacteriano e imunológico não é claramente compreendido. No entanto, partes importantes desses mecanismos são conhecidos (Tabela 2).

*Tabela 2 – Mecanismo de ação de alguns antibióticos.*

<b>MODO DE AÇÃO</b>	<b>GRUPO DE ANTIBIÓTICOS</b>
Interferência na produção da parede celular	Beta-lactina (penicilinas, carbapenêmicos, monobactâmicos, cefalosporinas), glicopeptídeo, bacitracina.
Obstrução da produção de proteínas	Anfenicols, aminoglicosídeos, aminocitols, macrolídeos, tetraciclina, lincosamidas.
Interferência da atividade da membrana da parede celular	Polipeptídeos
Obstrução da produção de DNA/RNA	Quinolonas
Inibição de processos metabólicos bacterianos	Sulfonamida, sulfonas, nitroimidazóis, nitrofuranos

Fonte: Ahiwe et al., 2021.

Apesar das diversas restrições, a utilização de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento ainda ocorre.

Baseado nisso e devido ao movimento global de restrição de uso como promotores de crescimento, surgem alternativas que envolvem o uso de prebióticos, probióticos, simbióticos, compostos fitogênicos e ácidos orgânicos para atenuar os desafios sanitários gerados nas atividades pecuárias (GADDE et al., 2017).

### **2.1.1 Ácidos orgânicos**

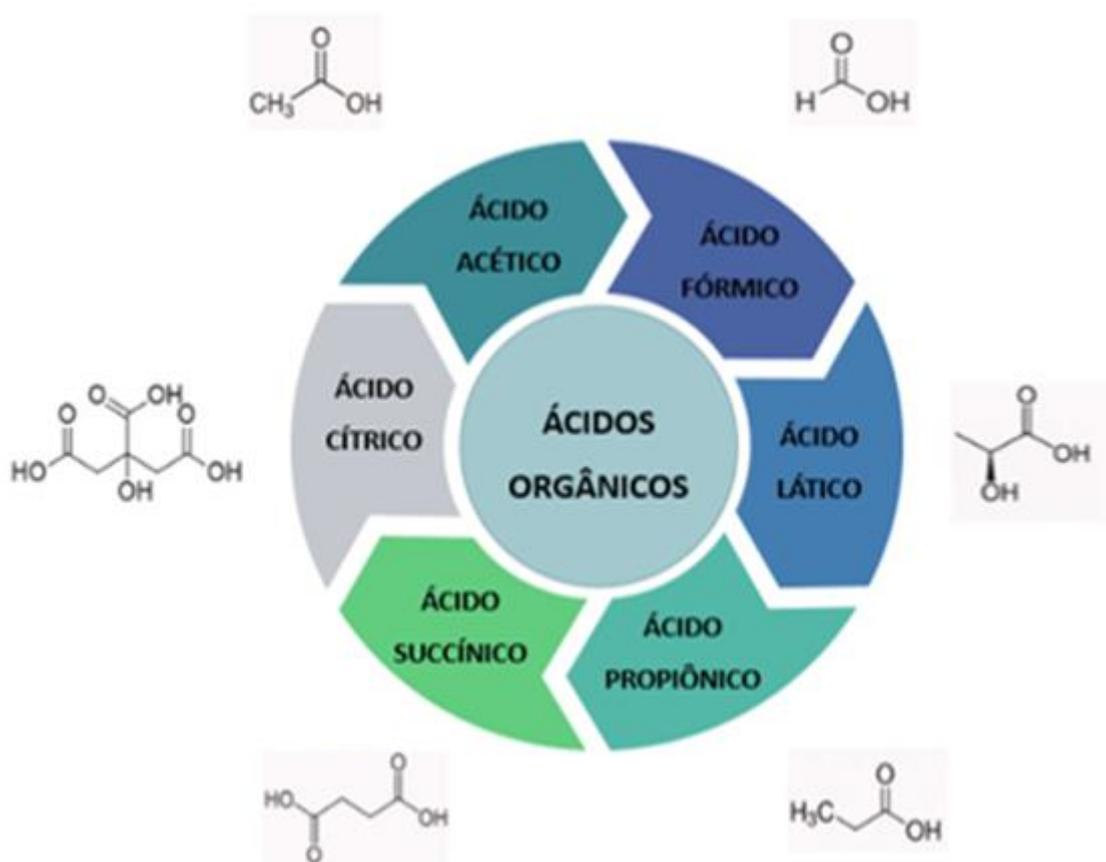
Com a necessidade por produtos avícolas de alta qualidade, explorar aditivos alimentares eficazes e naturais que possam estimular a capacidade produtiva latente de aves de produção, se faz necessária (WANG et al., 2019). Uma alternativa que vem de encontro com essa demanda são os ácidos orgânicos (AO). Inicialmente, o uso desses compostos tinha por objetivo controlar a deterioração de alimentos, originada através da proliferação desordenada de microrganismos que afetavam a qualidade seguido do valor nutritivo desses substratos (PYNE et al., 2022). Porém, especialmente na última década, esses compostos geraram grande interesse como melhoradores de desempenho na área de nutrição animal, devido aos efeitos positivos no controle de patógenos da microbiota intestinal e do sistema imunológico dos animais (PELUSIO et al., 2020).

Os ácidos orgânicos são componentes naturais de plantas e tecidos, inclusive do trato gastrointestinal de aves, sendo produzidos a partir do metabolismo de bactérias entéricas (WOLFENDEN et al., 2007). Esses compostos contém características ácidas e apresentam na sua formação uma estrutura carboxilica (COOH), que pode ser ligada com distintos grupos químicos e a partir desse mecanismo, diversos ácidos são gerados e as suas funcionalidades são multivariáveis (TALTAVULL et al., 2020).

Por serem divergentes e não possuírem o mesmo arranjo estrutural, a eficiência dos ácidos orgânicos no controle de patógenos é dissemelhante (SKRIVANOVÁ et al., 2011). Respostas obtidas a partir desses mecanismos podem ser atribuídas a vários fatores, incluindo, o potencial de neutralização do crescimento de microorganismos nos órgãos digestivos e respiratórios, redução

da capacidade tamponante das dietas e elevação da resposta imunológica das aves (PARK et al., 2009). Nos dias de hoje, existem diversos ácidos orgânicos que são sintetizados por microrganismos, que são divididos em ácidos de cadeia curta, média e longa (Figura 1).

*Figura 1 – Representação dos ácidos orgânicos de acordo com a cadeia carbônica.*



Fonte: Bangar et al., (2022). Adaptado por Roieski, (2022).

Ácidos orgânicos geram suas ações em vários tipos de célula e apresentam capacidade variável de penetração na membrana plásmica. No entanto, estes promovem a dissociação da estrutura do ácido orgânico dentro do lumén celular, onde inicia-se uma liberação de íons  $H^+$ , que reduzem o pH com o propósito de criar um ambiente estressante para as bactérias, levando-as a uma disfunção metabólica e consequente queda na atividade replicadora (HAQ et al., 2017). Essa disfunção ocorre devido ao pH das bactérias ser neutro no interior do citoplasma, e através disso, ocasiona-se uma desorganização das proteínas

funcionais através do desequilíbrio celular, onde grande parte dos prótons é exportada para o meio extracelular, fazendo com que a bactéria se torne fraca devido ao alto gasto energético necessário para provocar esta ação (RICKE, 2003). Outra consequência da presença do ácido no interior da célula é o aumento da pressão osmótica celular, que desencadeia o mecanismo de compensação de carga elétrica, onde a força iônica celular eleva-se, provocando um aumento nos níveis de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e glutamato, provocando a elevação da pressão mecânica sobre a parede do microrganismo até o rompimento (MENTEN et al., 2014).

Basicamente a força relativa dos ácidos é determinada pela sua constante de dissociação (pK<sub>a</sub>), que expressa a tendência de ionização de um determinado ácido. Na forma protonada (não dissociada), ácidos orgânicos podem penetrar passivamente na célula microbiana, liberando prótons e ânions, ocasionando dessa forma a redução do pH intracelular, o que inibe a ação de enzimas e leva o microrganismo à morte (MENTEN et al., 2014). Ácidos orgânicos com mais de um pK<sub>a</sub> ou misturas de ácidos orgânicos com diferentes níveis de pK<sub>a</sub> apresentam dissociação em diferentes fases de pH (Tabela 3) e através disso, podem manter a ação antimicrobiana em maior extensão do trato gastrointestinal (VIOLA; VIEIRA, 2007).

*Tabela 3 – Lista de ácidos orgânicos, conforme seu pK<sub>a</sub> de dissociação.*

ESTRUTURA QUÍMICA	NOME		pK <sub>a</sub>
	OFICIAL	COMUM	
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	Etanoico	Acético	04,75
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Propanoico	Propiônico	04,87
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Butanoico	Butírico	04,81
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	Pentanoico	Valérico	04,82
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H	Hexanoico	Caproico	04,84
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CO <sub>2</sub> H	Octanoico	Caprilico	04,89
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CO <sub>2</sub> H	Decanoico	Caprico	04,84
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CO <sub>2</sub> H	Dodecanoico	Laurico	05,30

Fonte: Menten et al., (2014). Adaptado de Solomons e Fryhle (2002).

No meio intracelular, ácidos de cadeia curta (C1 – C7), como o fórmico, acético, propiônico e o butírico levam ligeira vantagem em relação aos demais, pois produzem uma quantidade de prótons menor por molécula ao se

dissociarem, aumentando dessa forma a solubilidade em água (MENTEN et al., 2014).

O uso de ácidos orgânicos na alimentação apresenta potencial de elevação do desempenho e o crescimento de frangos de corte e proporciona maior digestibilidade de nutrientes e melhor aproveitamento de energia (PALAMIDI; MOUNTZOURIS, 2018). Em estudo elaborado por (SKRIVANOVA et al., 2007), em meios cultivados por *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*, ácidos de cadeia média (caprílico, cáprico e láurico) tiveram níveis de eficácia melhores quando comparados com os ácidos cítrico, succínico, fumárico, málico e lático.

Contudo, conclui-se que, embora seja comprovado que os ácidos orgânicos apresentem particularidades que auxiliam no melhor aproveitamento das proteínas e colaborem para redução das propriedades bacterianas contra microorganismos patogênicos, o uso desses aditivos ainda não está completamente validado (SEOK; HA, 2021). Variáveis em torno dos níveis de suplementação, bem como do arranjo nutricional, estado fisiológico e condição sanitária dos animais, são pontos a serem explorados para obtenção da precisão imunomoduladora desses compostos (ELHASSAN et al., 2019).

### **2.1.2 Colibacilose**

A colibacilose é uma doença causada pela bactéria gram-negativa *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) e atualmente caracteriza-se como uma das enfermidades de maior prevalência na avicultura (WANG et al., 2019). A alta incidência e consideráveis perdas econômicas associadas a essa doença à tornam uma preocupação sanitária de importância nacional e mundial (SONG et al., 2020). Embora a *Escherichia coli* esteja presente na flora do trato gastrointestinal normal de humanos e animais na forma comensal, presume-se que apenas as cepas com relativa especificidade sejam dotadas de fatores de virulência causadoras de doenças (GIOVANARDI et al., 2013). Baseado nisso e apesar da *E.coli* comensal não causar a colibacilose o monitoramento também apresenta importância na medicina veterinária.

Diretrizes baseadas nas tendências de resistência antimicrobiana tanto em *E. coli* comensal, quanto em *E. coli* patogênica aviária (APEC) colaboram

para o entendimento de isolados clínicos, pois a forma comensal é considerada um bom indicador da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos sobre as populações intestinais dessas bactérias em animais de produção (GAMBI et al., 2022). Apesar das variáveis comensais não terem significado clínico direto com distúrbios e enfermidades causadoras de danos à saúde animal, são consideradas como uma fonte potencial de genes de resistência para bactérias patogênicas (HESP et al., 2022).

Na indústria avícola, os antibióticos são os meios mais comuns utilizados para prevenir e tratar infecções decorrentes de APEC's (SALIU; VAHJEN; ZENTEK, 2017). Até o momento, a colibacilose tem sido uma das principais causas de perdas econômicas na avicultura mundial, e apesar disso, não existe nenhum método completamente eficaz para o seu controle (ŚMIAŁEK; KOWALCZYK; KONCICKI, 2020).

Outro fator responsável pelo aumento da gravidade do sistema é a ocorrência de resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado veterinário. Determinadas CEPAS desses patógenos são caracterizadas como multiresistentes, as quais, inibem as ações dos fármacos de forma gradual, potencializando a recepção de genes com maior resistência aos antibióticos para outras bactérias, dificultando desse modo, o tratamento desses agentes nos animais e no homem (NHUNG; CHANSIRIPORNCHAI; CARRIQUE-MAS, 2017).

Dentre os mecanismos de ação, *E. coli* caracteriza-se como uma bactéria oportunista, ou seja, faz com que aves infectadas com cepas patogênicas apresentem baixo desempenho zootécnico devido ao comprometimento da saúde intestinal, desencadeando quadros de diarreia sanguinolenta, anemia, lesões associadas a aerosaculite, peri-hepatite, pericardite, dentre outras doenças (GLOMBOWSKY et al., 2020). Essas condições patológicas são responsáveis por gerar problemas sanitários em toda a cadeia avícola, podendo causar ainda, mortalidade em alto nível dos plantéis, condenações nos abatedouros, embargos nas exportações, e ainda, elevação dos custos na produção oriundos de gastos com tratamento dos animais (MARCHESE et al., 2022).

Baseado nisso, intervenções dietéticas são utilizadas como ferramentas para o controle desses patógenos, que têm por objetivo atuar na alteração da

composição da microbiota intestinal e no desenvolvimento de cepas de *E. coli* patogênica para aves (OLNOOD et al., 2015). Ao fazer isso, a proporção de bactérias no trato gastrintestinal é alterada e melhorias no sistema ocorrem (LEE et al., 2021). Porém, apesar de existirem comprovações validadas sobre as distintas formas de controle dessa enfermidade, a profilaxia destaca-se como sendo a melhor alternativa para evitar a entrada desses patógenos nas granjas, uma vez que procedimentos básicos de biossegurança são adotados, as chances de contaminação são reduzidas e o tratamento com aditivos de forma terapêutica não se faz necessário.

### **2.1.3 Prebióticos**

Prebióticos são denominados como “substratos utilizados seletivamente por microrganismos que conferem benefício à saúde do hospedeiro”, e quando administrados por via oral são referidos especificamente como prebióticos dietéticos (BINDELS et al., 2015 ). Resumidamente, os prebióticos são um grupo de açúcares (polissacarídeos), resistentes à digestão no estômago e intestinos de animais não ruminantes, cuja função consiste na utilização de bactérias intestinais que realizam a conversão desses carboidratos indigeríveis em energia (DANKOWIAKOWSKA et al., 2019).

Atualmente, o uso de prebióticos apresenta alto interesse nas atividades pecuárias, devido as suas particularidades de uso, pois, a partir da utilização dessa classe de alimentos funcionais, melhorias nos índices produtivos das atividades ocorrem. Com o aumento da pressão para extinguir o uso de antibióticos na produção avícola, o uso desses aditivos torna-se indispensável (NOOREH et al., 2021). Os prebióticos comumente utilizados são os manano-oligossacarídeos (MOS), que são derivados da parede celular externa de leveduras (AL-KHALAIFA et al., 2019). Outros grupos comumente utilizados são os frutooligossacarídeos (FOS) e os galacto oligossacarídeos (GOS), por possuírem características consistentes de um prebiótico. Através do processo de fermentação do substrato prebiótico, originam-se os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que apresentam efeitos benéficos para a melhoria da saúde do trato TGI, e por sua vez, à melhoria da saúde do hospedeiro. Além disso, a

presença de AGCC serve como barreira para o estabelecimento de patógenos de origem alimentar no trato gastrintestinal (DITTOE; OLSON; RICKE, 2022).

Em pesquisa elaborada por Wen et al. (2021), descobriu-se que MOS, FOS e GOS possuem diferentes graus de proliferação, auto agregação e adesão na formação de *Lactobacillus*. Ou seja, apesar de apresentar um mesmo propósito, as funcionalidades desses compostos são variáveis, possuindo desde recursos para manutenção dos microrganismos entéricos do hospedeiro, até mecanismos de prevenção de doenças em ponto de estabelecimento e potencial de recuperação de infecções já existentes (BILAL et al., 2021). Esses aditivos possuem ainda, a capacidade de aumentar os níveis de bactérias promotoras da saúde intestinal, além de auxiliarem o processo de fermentação e tolerarem ambientes adversos, como o baixo oxigênio, pH e temperatura (REHMAN et al., 2020).

No momento em que o prebiótico chega ao intestino, especificamente no cólon, inicia-se o processo de fermentação seletiva. Essa fermentação resulta na ação e crescimento de dois tipos de bactéria lácticas de interesse zootécnico, as bactérias do gênero *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* (AL-KHALAIFA et al., 2019). Com a presença desse substrato, a microbiota intestinal desempenha um papel importante relacionada a manutenção da funcionalidade do trato digestivo, pois através desse mecanismo vários processos fisiológicos ocorrem, incluindo o desenvolvimento das funções intestinais, bem como, a síntese de micronutrientes seguido do aumento da eficiência do sistema imunológico dos animais (KRIDTAYOPAS et al., 2019).

Atualmente, pesquisas relacionadas ao uso de prébióticos apresentaram resultados promissores no controle de patógenos como *Escherichia coli* e a *Salmonella* spp., permitindo, estimular o adequado desenvolvimento dos sistemas funcionais dos animais (REHMAN et al., 2020). A partir dessa definição, pode-se deduzir que os aditivos prebióticos podem contribuir para um trato intestinal mais saudável e resultar em efeitos com características benéficas no desempenho das aves (AHIWE et al., 2021).

#### 2.1.4 Probióticos

Os probióticos são classificados como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades ideais, possibilitam uma série de benefícios ao hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Conferem aumento na imunidade, na saúde e no crescimento em todas as idades e classes de aves (ALAGAWANY et al., 2016). Além disso, geram um equilíbrio saudável das bactérias do trato gastrintestinal, o que eleva a resposta imunológica e previne o desenvolvimento de enfermidades (SOOMRO et al., 2019). Atualmente, os probióticos são considerados como aditivos “verdes” para alimentação animal e promissores substitutos de fármacos ao tratamento de doenças de interesse zootécnico (KASSEM et al., 2021).

Esses compostos apresentam como principal objetivo modificar a flora intestinal e assim, beneficiar o processo de digestão, através da adequação do pH e da maior atividade enzimática do trato gastrointestinal (SOOMRO et al., 2019). Os probióticos à base de *Bacillus* promovem a efetividade da saúde intestinal, pois reduzem os sinais de doenças entéricas através de vários mecanismos de atuação distintos, como exclusão competitiva, produção de peptídeos antimicrobianos, modificações na microflora intestinal e estimulação do sistema imunológico (GRANT; GAY; LILLEHOJ, 2018).

Dentre os inúmeros produtos disponíveis comercialmente, as quantidades, bem como o conjunto de espécies probióticas utilizadas, são variáveis, no entanto, o objetivo do uso é o mesmo. Algumas das espécies mais utilizadas são os *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophils*, *Bifidobacterim bifidum*, *Aspergillus oryzae*, dentre outros (KHAKSEFIDI; RAHIMI, 2005). O mecanismo de ação destes compostos consiste em propriedades enzimáticas que estabilizam a microflora intestinal e reduzem o número de metabólitos tóxicos, dessa forma, o estresse intestinal diminui, gerando uma organização no recrutamento das células do sistema imunológico, promovendo a eubiose intestinal (LIU et al., 2014).

Através destes benefícios, tanto de forma geral, quanto de forma específica, os probióticos possibilitam um bom funcionamento das bactérias no trato gastrintestinal. Baseado nisso, a indústria têm aumentado a demanda por

estas substâncias, devido a sua funcionalidade e por seu uso ser aprovado sem restrição e ser validado por diversos países (GADDE et al., 2017).

### **3 ARTIGO 1: PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUAS COMBINAÇÕES SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA PARA AVES**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo a ser submetido com as seções de acordo com as orientações da Revista Brasileira de Ciência Avícola.

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Diversos são os fatores que fazem com que a avicultura Brasileira seja destacada mundialmente. Sem dúvidas, a adequação de fatores relacionados a nutrição, sanidade e bem-estar dos animais, colaboraram para o aumento do potencial produtivo e a expansão de novos mercados no exterior (OLADOKUN; ADEWOLE, 2020). Embora a implementação dessas práticas apresente uma adequada relação de custo-benefício para o controle de enfermidades, os antimicrobianos ainda são considerados ferramenta para o controle de patógenos nos plantéis avícolas (ROBERTSON, 2020).

Além da finalidade terapêutica, o uso dessas substâncias está relacionado com medidas de profilaxia do lote, cujo propósito é atenuar o desenvolvimento de enfermidades bacterianas (FASINA et al., 2016). *Escherichia coli* para aves (APEC) são responsáveis por quedas produtivas na avicultura. Além disso, existem preocupações inerentes a medicina humana já que cepas de APEC carregam genes de resistência a antimicrobianos, reduzindo a eficiência de fármacos comercialmente disponíveis (THOMRONGSUWANNAKIJ et al., 2022).

Um caminho promissor para o aprimoramento do crescimento e da saúde das aves são os aditivos alimentares probióticos e prebióticos. Os probióticos, mais comumente referidos na produção animal como microbianos de alimentação direta, caracterizam-se como culturas bacterianas vivas que se instalam no intestino do animal e, idealmente, promovem benefícios (Summers; Turner; Tillman, 2022). Em contrapartida, quando utilizados, os prebióticos são componentes da ração não digeríveis pelo hospedeiro e são especificamente selecionados para promover o crescimento das bactérias benéficas do TGI (JOHNSON et al., 2019).

Outra possibilidade de substitutos na área dos melhoradores de desempenho, são os ácidos orgânicos, que apresentam potencial de redução do crescimento de microorganismos no trato digestório e respiratório, redução da capacidade tamponante das dietas e elevação da resposta imunológica das aves (PARK et al., 2009). De maneira geral, o uso desses compostos apresenta ação antimicrobiana, que por consequência, promove a redução da ação e o desenvolvimento de agentes nocivos, permitindo melhores condições no aproveitamento das características alimentares, na modulação do sistema imunológico e na anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal dos animais (SHARMA et al., 2018).

Baseado nisso e diante de um cenário de produção animal que apresenta constante desenvolvimento, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de produtos comerciais compostos por prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos como aditivos alimentares e seus efeitos sobre as variáveis de desempenho e microbiológicas de frangos de corte desafiados por *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC).

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Catarina, sob o protocolo de Nº 9212210721.

### 3.2.1 Ensaio piloto

O teste foi executado no aviário experimental para frangos de corte da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Santa Catarina, localizada no município de Guatambu, SC, Brasil. Foram utilizados três boxes de 2m<sup>2</sup>, com bebedouros tipo nipple e comedouros tubulares com fornecimento de ração e água *ad libitum*. Foram alojados 15 frangos de corte, machos, da linhagem comercial *Cobb*. Aos 14 dias de idade, os animais foram desafiados com 1mL de APEC por gavagem. Os tratamentos foram: grupo 1. Controle negativo: Animais sem desafio, Grupo 2: desafiado com  $1,24 \times 10^7$  UFC/mL, Grupo 3: Aves desafiadas com  $1,19 \times 10^9$  UFC/mL. As cepas foram obtidas a partir do isolamento de campo, provenientes do Laboratório de Medicina Aviária, da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Foram avaliadas as variáveis ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), consumo de ração (CR) e viabilidade (%) aos 14, 35 e 42 dias e, com base nos resultados encontrados, definiu-se como cepa de maior impacto nas variáveis definidas a UFC de  $1 \times 10^7$  sendo essa a escolhida para utilização do teste real. As aves não apresentaram mortalidade, porém, tiveram ganho de peso 8% inferior às aves do grupo não desafiado aos 42 dias de idade. As aves desafiadas com  $1 \times 10^9$  também tiveram queda no ganho de peso, entretanto, menos significativa.

### **3.2.2 Preparo do inóculo para o experimento**

As amostras de APEC - LMA/UEL-046 foram incubadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37°C de 18-24 horas. Posteriormente, uma alíquota foi retirada para a determinação de UFC/mL do inóculo por diluição em série e plaqueamento em agar Mc Conkey.

### **3.2.3 Desafio**

As aves foram desafiadas via gavagem aos 14 dias de idade com 1 mL de inóculo de APEC  $1,24 \times 10^7$  UFC/mL.

### **3.2.4 Produtos utilizados**

Para realização deste experimento foram utilizados dois produtos comerciais distintos e um antimicrobiano. O primeiro caracteriza-se como um probiótico composto por onze cepas definidas de bactérias que objetiva estabelecer uma microbiota protetora no trato gastrointestinal das aves, sendo esses: Três cepas de *Lactobacillus bulgaricus* (10 g), duas cepas de *Lactobacillus casei* (10 g), duas cepas de *Lactobacillus cellobiosus* (10 g), três cepas de *Lactobacillus fermentum* (10 g) e uma cepa de *Lactobacillus helveticus* (10 g). O fornecimento ocorreu conforme as especificações do fabricante, (60g/10.000 aves) fornecidos três vezes no ciclo de produção, com 1, 10 e 28 dias de vida, via água de bebida.

O segundo produto utilizado trata-se de um prebiótico, composto por mananoligossacarídeos e beta glucanos oriundos de parede de levedura e ácidos orgânicos (25,00 g), formiato de amônio (10,30 g), ácido fórmico (05,15

g), propionato de amônio (03,43 g) e ácido acético (00,86 g). Adicionado na proporção de 1kg/ton de ração, durante todo período experimental.

Por último o antibiótico a base de enramicina (8%) foi fornecido aos animais via ração (10 mg enramicina/kg de ração) durante os 42 dias de avaliação.

### **3.2.5 Animais, instalações e alimentação**

O estudo foi realizado no aviário experimental para frangos de corte da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Santa Catarina, localizada no município de Guatambu, SC, Brasil. Um total de 480 pintainhos machos de um dia de vida de uma linhagem comercial foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 5 repetições com 16 aves cada. O alojamento foi em um galpão de pressão negativa, em boxes de 2,0 m<sup>2</sup>, com ração e água fornecidas *ad libitum* via comedouros tubulares e bebedouros do tipo *nipple*, respectivamente. O programa de luz utilizado foi baseado nas orientações do manual da linhagem.

Os tratamentos foram divididos da seguinte forma: (T1) Controle positivo (CP) - ração basal + inoculação; (T2) Controle negativo (CN) - ração basal sem aditivo e sem inoculação; (T3) Tratamento com antibiótico (ATB - Enramicina dose) – aves inoculadas + ração basal com promotor de crescimento; (T4) Tratamento com probiótico (PRO) - aves inoculadas + ração basal com produto probiótico; (T5) Tratamento com probiótico e ácidos orgânicos (PRE+AO) - aves inoculadas + ração basal com produto composto por probiótico e ácidos orgânicos; (T6) Tratamento com probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos (PRO+PRE+AO) - aves inoculadas + ração basal com produtos compostos por probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos.

As rações basais (Tabela 4) foram formuladas conforme exigências para frangos de corte de alto desempenho conforme composição e exigências nutricionais estabelecidas pelas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (ROSTAGNO et al., 2011). O procedimento de mistura dos ingredientes foi realizado nas dependências do setor de avicultura da UDESC - OESTE, campus de Chapecó – Santa Catarina, em um misturador horizontal com capacidade de 150 kg.

*Tabela 4 – Composição percentual e nutricional das dietas utilizadas nas diferentes fases de criação.*

Ingredientes (mg/kg)	Idade (dias)		
	1 – 21	22 - 35	36 - 42
Milho 7,88% CP	587.87	616.44	657.11
Farelo de soja 46% CP	344.33	309.93	272.79
Óleo de soja	29.03	38.42	38.02
Fosfato bicálcico	16.15	13.93	11.75
Calcário calcítico	08.64	07.91	07.09
Sal iodado	04.82	04.57	04.44
DL-Metionina – 99%	03.25	03.04	02.81
L-lisina – 78%	02.94	02.89	03.10
L-treonina – 99%	00.97	00.86	00.88
Mistura básica de vitaminas e minerais <sup>1</sup>	02.00	02.00	02.00
Composição química calculada	100	100	100
Energia (kcal/kg)	3050	3150	3200
Proteína bruta (%)	21.20	19.80	18.40
Cálcio (%)	0.84	0.76	0.66
Fósforo (%)	0.40	0.35	0.31
Lisina digestível (%)	1.22	1.13	1.06
Metionina digestível (%)	0.47	0.45	0.42
Metionina + cistina digestível (%)	0.88	0.83	0.77
Treonina digestível (%)	0.79	0.73	0.69
Triptofano digestível (%)	0.21	0.20	0.19
Sódio (%)	0.21	0.20	0.19

<sup>1</sup> Níveis mínimos de vitaminas e minerais por kg de produto: vitamina A (5.000.000 UI); vitamina D3 (1.000.000 UI); vitamina E (15.000 UI); vitamina K3 (1,500 mg); vitamina B1 (1,500 mg); vitamina B2 (3.000 mg); vitamina B6 (2.000 mg); vitamina B12 (7.000 mcg); ácido fólico (500 mg); ácido nicotínico (15 g); ácido pantoténico (7000 mcg); colina (80 g); biotina (100 mg); Cobre (10 g); ferro (50 g); iodo (1.000 mg); manganês (80 g); selênio (300 mg); zinco (70 g); umidade mínima (20 g); matéria mineral máxima (980 g). Promotor de crescimento (Enramicina, 10 mg/kg de ração); agente coccidiostático (salinomina, 64 mg/kg de ração).

### 3.2.6 Variáveis de desempenho

O ganho de peso dos frangos, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade do lote foram avaliados nos períodos de 1 a 21, 1 a 35 e 1 a 42 dias

de produção. Os animais e as sobras de ração foram pesados no final de cada período, para posteriores cálculos do consumo de ração (CR, kg), ganho de peso (GP, kg), ganho de peso médio diário (g/ave/dia) e conversão alimentar (CA), que foi obtida pela divisão entre o CR e GP no período. A viabilidade (VIAB, %) foi determinada através da proporção do número final e inicial de aves em cada período.

Também foi calculado o índice de eficiência produtiva (IEP), segundo a fórmula  $IEP = ((GPD \times Viabilidade) / CA) \times 100$ , onde: GPD=Ganho de peso médio diário (g) e CA=conversão alimentar.

### **3.2.7 Quantificação de *Enterobactereacea* nas excretas e avaliação de translocação bacteriana para o fígado**

Aos 42 dias de idade realizou-se a coleta de fezes e amostras de fígado para a análise de quantificação de *E. coli* nas amostras de fezes e presença/ausência nos fígados, com base em uma ave por boxe. As coletas de excretas foram feitas após a verificação da excreção em papel pardo e coleta em sacos plásticos estéreis.

No laboratório realizou-se inicialmente a diluição (1:10) em PBS (phosphate-buffered saline - pH 7,2) e posterior diluição seriada e plaqueamento em ágar McConkey com incubação a 37°C de 18-24h para a determinação de UFC/g. Já as amostras de fígado foram incubadas em caldo (BHI) à 37°C por 18-24 horas. Posteriormente, os inóculos foram plaqueados em Ágar MacConkey e incubados à 37°C por 18-24h. As colônias suspeitas de *E.coli* foram submetidas aos testes bioquímicos (TSI, Citrato, ureia, Sim, Sorbitol) para a devida identificação.

### **3.2.8 Análise estatística**

Os dados foram submetidos a análise de normalidade de distribuição os dados e em seguida e suas variáveis passaram pelo teste Análise de Variância (ANOVA). Em casos de diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

### 3.3 RESULTADOS

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre o desempenho das aves em todas as fases de criação avaliadas (Tabela 5). No período de 01-21 dias, o consumo de ração (CR) foi menor ( $P < 0,012$ ) para o grupo CP em comparação aos tratamentos ATB, PRO e PRE + AO. No entanto, CP não se diferiu significativamente de CN e PRO + PRE + AO. Para a variável de ganho de peso (GP) os maiores e melhores resultados ( $P < 0,001$ ) foram dos grupos CN, ATB e PRE + AO, não diferindo de CP e PRO, diferindo-se apenas do tratamento PRO + PRE + AO, respectivamente. Para a variável de conversão alimentar (CA) o tratamento CP apresentou menores resultados em relação ( $P < 0,007$ ) aos grupos PRO e PRO + PRE + AO. Entretanto, quando comparado com CN, ATB e PRE + AO, essa diferença não foi identificada.

Para o período de 01-35 dias, as aves do grupo CP consumiram menos ração ( $P < 0,001$ ) quando comparadas com os tratamentos ATB, PRO, e PRE + AO. Porém, não houve diferença estatística com os grupos CN e PRO + PRE + AO. Na avaliação de GP os tratamentos ATB e PRO apresentaram ganhos superiores ( $P < 0,001$ ) que CP, CN e PRO + PRE + AO.

Porém, ambos apresentaram resultado igual ao grupo composto por PRE + AO. Ainda, durante o mesmo período avaliado, a CA do grupo contendo probiótico (PRO) se sobressaiu ( $P < 0,046$ ) em relação as aves que receberam a suplementação de PRO + PRE + AO. Todavia, PRO não foi diferente de CP, CN, ATB e PRE + AO.

Na fase final de avaliação (01-42 dias) os tratamentos não apresentaram diferença significativa para as variáveis de CR e CA. Porém, houve diferença no GP dos animais, onde os tratamentos ATB e PRO foram superiores em relação ao CN e a combinação de PRO + PRE + AO. Tratamentos CP e PRE + AO não foram diferentes de ATB e PRO. A viabilidade do lote não foi influenciada pelos tratamentos em nenhuma das fases avaliadas ( $P > 0,05$ ).

*Tabela 5 - Médias obtidas para consumo de ração (CR, kg), ganho de peso (GP, kg), conversão alimentar (CA) e viabilidade (VIAB, %) das aves submetidas aos diferentes tratamentos nos períodos de 01 a 21, 01 a 35 e 01 a 42 dias de vida.*

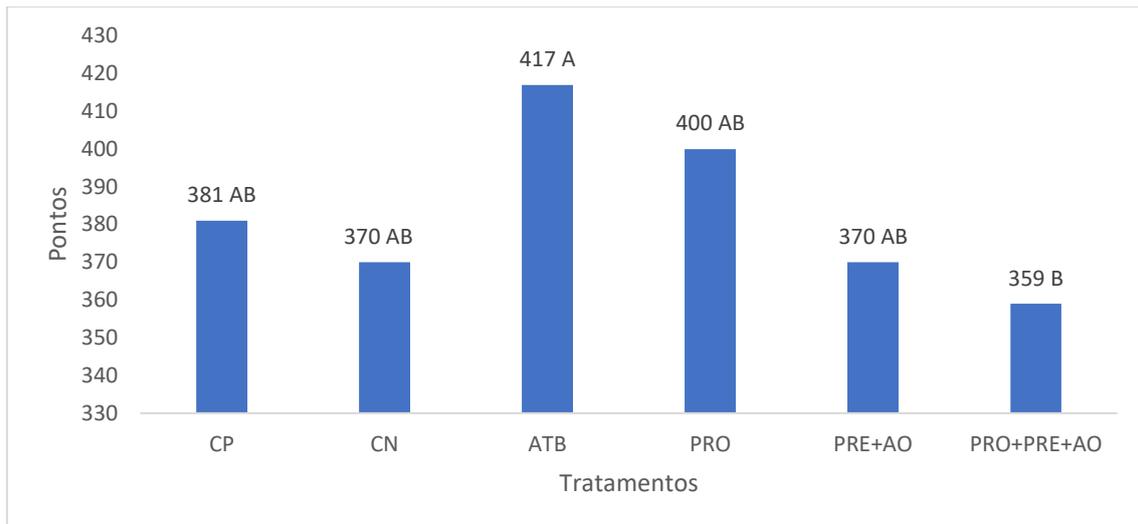
CR	GP	CA	VIAB
----	----	----	------

<b>Variáveis</b>	<b>01-21 dias</b>			
CP	1,351 B	0,958 AB	1,420 B	100,00
CN	1,434 AB	0,993 A	1,440 AB	98,75
ATB	1,523 A	1,004 A	1,510 AB	100,00
PRO	1,485 A	0,961 AB	1,540 A	98,43
PRE+AO	1,501 A	1,000 A	1,490 AB	97,50
PRO+PRE+AO	1,439 AB	0,928 B	1,550 A	97,50
<b>P</b>	0,012	<0,001	0,007	0,483
<b>CV (%)</b>	4,54	2,57	3,92	2,64
	<b>01-35 dias</b>			
CP	3,573 D	1,817 BC	1,970 AB	100,00
CN	3,630 CD	1,818 BC	2,000 AB	98,75
ATB	3,960 A	2,072 A	1,910 AB	100,00
PRO	3,915 AB	2,060 A	1,900 B	98,43
PRE+AO	3,879 ABC	1,969 AB	1,970 AB	96,25
PRO+PRE+AO	3,670 BCD	1,765 C	2,080 A	97,50
<b>P</b>	<0,001	<0,001	0,046	0,408
<b>CV (%)</b>	3,63	4,98	3,43	3,09
	<b>01- 42 dias</b>			
CP	5,264	2,917 AB	1,80	98,75
CN	5,279	2,880 B	1,83	98,75
ATB	5,366	3,088 A	1,74	98,43
PRO	5,533	3,073 A	1,80	98,43
PRE+AO	5,370	2,963 AB	1,81	97,50
PRO+PRE+AO	5,149	2,838 B	1,81	97,50
<b>P</b>	0,143	<0,001	0,282	0,961
<b>CV (%)</b>	4,25	2,94	3,65	3,09

A,B – Presença de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (5%). CV = Coeficiente de variação. CP = Controle positivo; CN = Controle negativo; ATB=antibiótico; PRO=probiótico; PRE+AO=prebiótico + ácidos orgânicos; PRO+PRE+AO=probióticos + prebióticos + ácidos orgânicos.

Os dados componentes da avaliação do índice de eficiência produtiva (IEP) apontaram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos analisados (Figura 2) onde as aves alimentadas com dietas com ATB apresentaram resultado superior quando comparadas com aquelas que receberam suplementação de PRO + PRE + AO. Apesar disso, ATB não se diferiu de CP, CN, PRO e PRE + AO.

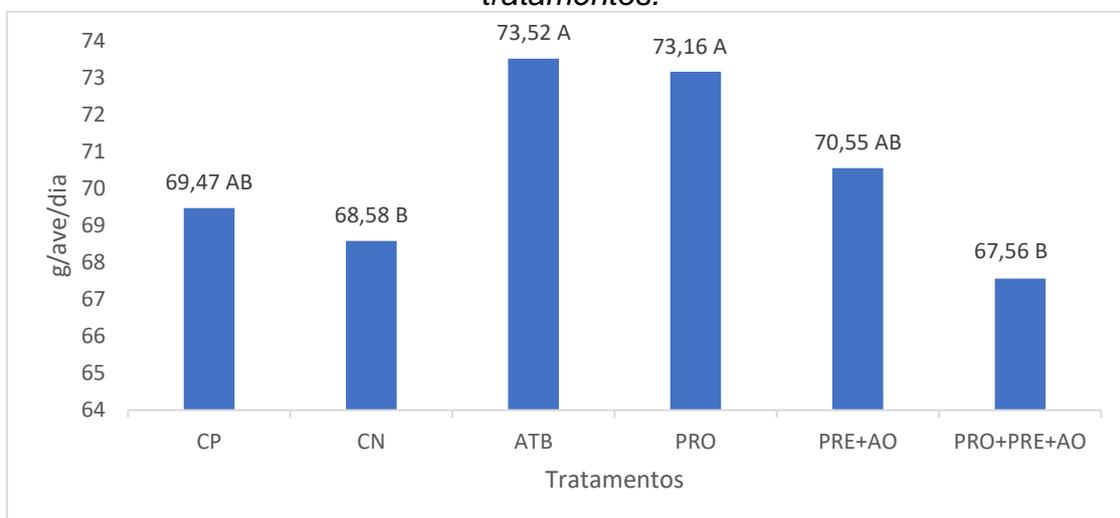
*Figura 2 - Índice de eficiência produtiva das aves submetidas aos diferentes tratamentos.*



A,B – Presença de letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).  
CV=7,07%; P=0,0027.

O ganho de peso médio diário foi maior ( $P=0,0077$ ) nas aves dos grupos que receberam rações com antibiótico e probiótico quando comparadas com as dos grupos controle negativo e PRO+PRE+AO conforme exposto na (Figura 3).

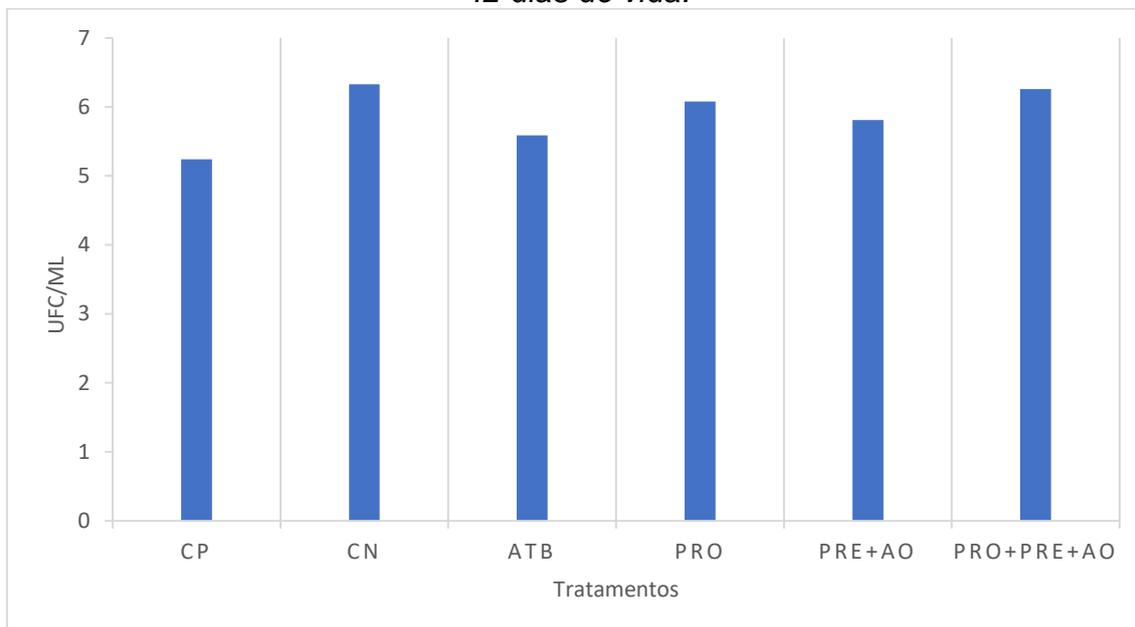
*Figura 3 – Ganho de peso médio diário das aves submetidas aos diferentes tratamentos.*



A,B – Presença de letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).  
CV=2,94%; P=0,0077.

No que tange a quantificação de Enterobacteriaceae nas fezes não apresentaram diferenças significativas ( $P=0,275$ ) entre os tratamentos avaliados (Figura 4).

Figura 4 - Médias obtidas através da contagem de unidade formadora de colônia (UFC) de *Enterobactereacea total* nas fezes dos animais no período de 42 dias de vida.



CV=13,13%; P=0,275.

Das amostras avaliadas no teste de translocação bacteriana, que objetiva identificar a presença ou ausência de microrganismos no fígado, um único resultado do tratamento contendo prebiótico e ácidos orgânicos (PRE + AO) foi negativo. Enquanto todas as demais amostras foram positivas (Tabela 6).

Tabela 6 - Presença ou ausência de *Escherichia coli* no fígado.

TRATAMENTOS	REPETIÇÕES			
	R1	R2	R3	R4
CN	+	+	+	+
CP	+	+	+	+
ATB	+	+	+	+
PRO	+	+	+	+
PRE + AO	+	+	-	+
PRO + PRE + AO	+	+	+	+

(+) = Resultado positivo; (-) = Resultado negativo.

### 3.4 DISCUSSÃO

No cenário de produção atual, os alimentos de origem animal são dependentes de diversos mecanismos que compõem o sistema na busca por melhorias nas características produtivas. Dentre esses, a segurança alimentar

destaca-se, baseado na demanda pela erradicação do uso de antimicrobianos e conseqüentemente no uso de produtos alternativos, que ganham campo e espaço para atuação no segmento.

O CR das aves do grupo CP foi menor que as que receberam antibiótico e os tratamentos PRO e PRE + AO até os 21 dias. Essa redução de consumo pode estar associada com o impacto gerado após o estabelecimento de APEC no TGI. De acordo com Mellata (2013) após a colonização da bactéria no organismo do hospedeiro, disfunções metabólicas são geradas, implicando na diminuição do CR e conseqüente redução no desempenho de crescimento dos animais. Um fator que explica um dos resultados encontrados se origina a partir do fornecimento de probióticos. O uso desses agentes promove o equilíbrio da microbiota do TGI em situações desfavoráveis, o que leva a um maior consumo de ração de frangos de corte, especialmente nas fases iniciais (HAMASALIM, 2016). No entanto, no período de 1 a 42 dias não se verificou diferenças no consumo de ração ( $P>0,05$ ).

Na avaliação de GP, as aves que receberam o ATB, PRO e PRE + AO apresentaram a maior alíquota durante os três períodos avaliados (01-21; 01-35; 01-42). O uso individual ou associado de prebióticos e probióticos promove aumento no GP dos animais controlando o crescimento e desenvolvimento de patógenos entéricos (ABD EL-GHANY et al., 2022). A melhora no ganho de peso pode estar associada à capacidade que os probióticos tem de estimular a ação de enzimas como amilase, protease e lipase, que promovem aumento da taxa de digestão dos nutrientes da ração, auxiliando na digestibilidade do amido, gordura e proteína (REHMAN et al., 2020; ABD EL-HACK et al., 2020). Em contrapartida, os MOS tem como mecanismo de base, um ligante de alta afinidade para bactérias e fornecem um sítio de ligação competitivo. Assim, os patógenos se ligam ao MOS em vez da parede intestinal, executando seu trânsito sem serem colonizados (BENITES et al., 2008). Promovendo dessa forma, a melhor absorção de nutrientes e conseqüentemente, o GP dos animais.

A CA nos períodos de 1 a 21 e 1 a 35 foi pior nas aves do grupo que recebeu a combinação PRO + PRE + AO quando comparadas às do grupo CP (1 a 21 dias) e às do grupo PRO (1 a 35 dias), além de ser numericamente superior às CA dos demais grupos em ambos os períodos. Em controvérsia e

conforme as expectativas baseadas no desempenho individual desses compostos, esperava-se que melhores resultados para CA fossem desencadeados a partir da combinação de PRO + PRE + AO. Como descrito por alguns pesquisadores, a união desses agentes é considerada uma estratégia nutricional que potencializa a produtividade animal em situações adversas, especialmente em dietas livres de antimicrobianos químicos (FORNAZIER et al., 2019). Mín et al. (2016) avaliaram um simbiótico contendo *Bacillus* spp. e Oligossacarídeos e constataram aumento da CA quando comparado com o grupo controle (sem aditivo) durante todos os períodos avaliados (01-21; 01-35; 01-42).

Em contrapartida, em pesquisa elaborada por Fornazier et al., (2019) o uso de um simbiótico com base em *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* não apresentou diferença significativa para a CA de frangos de corte durante os períodos de 01-21 e 01-42 dias. Variações da microbiota intestinal seguida da alta carga viral com condições ambientais desfavoráveis, são alguns exemplos de fatores que inibem a ação sinérgica dos compostos, como visto no estudo anterior e no presente trabalho.

Um ponto que cabe discussão é o fato das aves do grupo CN (que não foram desafiadas aos 14 dias) não terem apresentado desempenho diferente das que receberam o antibiótico no período de 1 a 21 dias. Entretanto, no período de 1 a 35 dias o desempenho desses animais (CN) foi inferior, o que mostra que houve contaminação desses animais pela *E. coli* presente no ambiente, que ocorreu provavelmente pela cama. Já no período de 1 a 42 dias, diferente dos períodos anteriores, a única variável de desempenho que sofreu efeito dos tratamentos foi o ganho de peso (GP), o que sugere que os animais se adaptaram ao desafio causada pelo *E. coli* após os 35 dias de vida.

Sobre os resultados do IEP, as aves que receberam ATB se sobressaíram em relação ao grupo PRO + PRE + AO. Pressupõem-se que as diferenças no desempenho dos animais ocorreram devido ao mecanismo de ação do conjunto de prebióticos, probióticos e ácidos orgânicos utilizados. De acordo com o arranjo probiótico e dos demais componentes do blend, subespécies ou cepas distintas são capazes de produzir diferentes classes de enzimas e peptídeos antimicrobianos em quantidades variáveis, e a partir disso, a atividade do

simbiótico com a digesta e a microbiota intestinal sofre alteração, modificando o processo sinérgico e conseqüentemente a ação diante da combinação desses agentes (GRANT; GAY; LILLEHOJ, 2018).

Para avaliação da contagem de UFC de *Enterobactereacea* nas fezes e na análise de translocação bacteriana, constatou-se diante dos resultados que não houve ação bactericida dos compostos avaliados. Diante desse cenário, uma hipótese que fortalece essa suposição pode ser explicada a partir do mecanismo de exclusão competitiva (EC) da bactéria através do conjunto de produtos utilizados. Substâncias com características de EC podem ser originadas a partir de um ou mais organismos, que apresentam por objetivo a limitação da ação e o desenvolvimento de patógenos através da competição com agentes infecciosos por nutrientes e sítios de ligação, produção de AGCC inibitórios, alterações do pH intestinal e a produção de substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas (HOFACRE et al., 2019).

Desse modo, presume-se que a partir das análises realizadas, que apesar dos compostos oferecerem um ambiente menos favorável para o desenvolvimento das bactérias patogênicas, as mesmas não foram eliminadas.

Porém, não dispuseram de sua plena atuação patogênica responsável por causar diferenças dos parâmetros de produção em todas as fases durante o período avaliado.

### 3.5 CONCLUSÃO

O impacto gerado pela contaminação das aves com a APEC foi mais significativo até os 35 dias de idade nos parâmetros produtivos, sem influenciar a viabilidade do lote.

O uso do antibiótico e dos produtos compostos por probióticos e prebióticos + ácidos orgânicos proporcionou maior ganho de peso das aves nos períodos avaliados, entretanto, não afetou a contagem e a presença de *E. coli* no fígado e *Enterobactereacea* no intestino, respectivamente.

A combinação dos produtos à base de probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos reduziu a conversão alimentar e o ganho de peso das aves.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A utilização dos produtos alternativos compostos por probióticos e prebióticos associados a ácidos orgânicos se mostrou uma boa alternativa para substituir os antibióticos como melhorador de desempenho na produção de aves. O uso desses produtos proporcionou resultados satisfatórios em relação ao desempenho das aves desafiadas, porém, a combinação dos três não gerou resultados interessantes.

A pesquisa não mostrou resultados que permitam concluir que existe ação bactericida dos produtos testados, dentre as hipóteses para tal explicação, supõe-se que a composição dos produtos avaliados possibilitou a formação de mecanismos de exclusão competitiva, que podem ter influenciado positivamente na absorção de nutrientes.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-GHANY, W. A. et al. Comparative Efficacy of Postbiotic, Probiotic, and Antibiotic Against Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. **Poultry Science**, p. 101988, 2022.
- AHIWE, E. U. et al. Can probiotic or prebiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) serve as alternatives to in-feed antibiotics for healthy or disease-challenged broiler chickens?: a review. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 30, n. 3, p. 100164, 2021.
- AL-KHALAIFA, H. et al. Effect of dietary probiotics and prebiotics on the performance of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4465–4479, 1 out. 2019.
- ALAGAWANY, M. et al. Individual and combined effects of crude protein, methionine, and probiotic levels on laying hen productive performance and nitrogen pollution in the manure. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 22, p. 22906–22913, 1 nov. 2016.
- AMIRI, N. et al. Effects of nanoencapsulated cumin essential oil as an alternative to the antibiotic growth promoter in broiler diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 29, n. 4, p. 875–885, 1 dez. 2020.
- ANUAL, R. I. O. Relatório anual 2022. 2022.
- AROEIRA, C. N. et al. **A review on growth promoters still allowed in cattle and pig production** *Livestock Science* Elsevier B.V., , 1 maio 2021.
- BAILEY, M. A. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* from antibiotic-free broilers during organic and conventional processing. **Poultry Science**, v. 98, n. 3, p. 1447–1454, 2019.
- BEN LAGHA, A. et al. **Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production** *Veterinary Research* BioMed Central Ltd., , 11 abr. 2017. Disponível em: <<https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-017-0425-6>>. Acesso em: 18 jun. 2021
- BENITES, V. et al. Effect of dietary mannan oligosaccharide from bio-mos or SAF-mannan on live performance of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, n. 4, p. 471–475, 2008.
- BILAL, M. et al. Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, p. 100871, 2021.
- DANKOWIAKOWSKA, A. et al. Effects of in ovo injection of prebiotics and synbiotics on the productive performance and microstructural features of the superficial pectoral muscle in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 5157–5165, 1 out. 2019.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. **Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action**. Poultry Science. **Anais...Poultry Science Association**, 1 abr. 2005

DITTOE, D. K.; OLSON, E. G.; RICKE, S. C. Impact of the gastrointestinal microbiome and fermentation metabolites on broiler performance. **Poultry Science**, v. 101, n. 5, p. 101786, 2022.

ELHASSAN, M.M.O; ALI, A.M; BLANCH, A; KEHLET, A.B; MADEKUROZWA, M.C. **Morphological responses of the small intestine of broiler chicks to dietary supplementation with a probiotic, acidifiers, and their combination**. Journal os Applied Poultry Research, v. 28, n.1, p. 108 - 117, 2019.

EUROPEAN UNION. **Regulation (ec) no 1831/2003 of the european parliament and of the council of 22 september 2003 on additives for use in animal nutrition**. Bruxelas: [s.n.].

FASINA, Y. O. et al. Effect of Clostridium perfringens infection and antibiotic administration on microbiota in the small intestine of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 95, n. 2, p. 247–260, 25 fev. 2016.

FDA. **New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI Center for Veterinary Medicine**, nov. 2013. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cvm-gfi-213-new-animal-drugs-and-new-animal-drug-combination-products-administered-or-medicated-feed>>.

FORNAZIER, R. et al. A Symbiotic Improves Performance and Carcass Yield of Broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, n. 2, p. 383–389, 2019.

GADDE, U. et al. **Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review** **Animal Health Research Reviews** Cambridge University Press, , jun. 2017.

GALLI, G. M. et al. Growth performance and meat quality of broilers fed with microencapsulated organic acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 271, p. 114706, 1 jan. 2021.

GAMBI, L. et al. The resistome of commensal Escherichia coli isolated from broiler carcasses “produced without the use of antibiotics”a. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, p. 1–7, 2022.

GAMBOA-CRUZ, C. et al. Assessing antibiotic residues in piglet liver and kidney samples: How to manage the results obtained. **Food Control**, v. 122, p. 107819, 1 abr. 2021.

GIOVANARDI, D. et al. Characterization and antimicrobial resistance analysis of avian pathogenic Escherichia coli isolated from Italian turkey flocks. **Poultry Science**, v. 92, n. 10, p. 2661–2667, 1 out. 2013.

GLOMBOWSKY, P. et al. Experimental infection with *Escherichia coli* in broilers: Impacts of the disease and benefits of preventive consumption of a stimulator of homeopathic immunity. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, n. September, p. 104570, 2020.

GONZALES, E.; MELLO, H. H. D. C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, v. 13, p. 48–53, 2012.

GONZALEZ RONQUILLO, M.; ANGELES HERNANDEZ, J. C. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. **Food Control**, v. 72, p. 255–267, 1 fev. 2017.

GRANT, A.; GAY, C. G.; LILLEHOJ, H. S. *Bacillus* spp. as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry. **Avian Pathology**, v. 47, n. 4, p. 339–351, 2018.

HAMASALIM, H. J. Synbiotic as Feed Additives Relating to Animal Health and Performance. **Advances in Microbiology**, v. 06, n. 04, p. 288–302, 2016.

HAQ, Z. et al. Advances in role of organic acids in poultry nutrition: A review. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 9, n. 4, p. 2152–2157, dez. 2017.

HESP, A. et al. Antimicrobial resistance monitoring in commensal and clinical *Escherichia coli* from broiler chickens : Differences and similarities. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 204, n. September 2021, p. 105663, 2022.

HOFACRE, C. L. et al. Effect of a Competitive Exclusion Culture in a Necrotic Enteritis Challenge Model in Broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, n. 2, p. 350–355, 2019.

JOHNSON, C. N. et al. Administration of a postbiotic causes immunomodulatory responses in broiler gut and reduces disease pathogenesis following challenge. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, 2019.

KAIRMI, S. H. et al. Effects of therapeutic levels of dietary antibiotics on the cecal microbiome composition of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, p. 101864, 2022.

KHAKSEFIDI, A.; RAHIMI, S. Effect of probiotic inclusion in the diet of broiler chickens on performance, feed efficiency and carcass quality. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1153–1156, 2005.

KIM, W. S.; MORISHITA, T. Y.; DONG, F. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* between conventional and organic broiler flocks. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 30, n. 2, p. 100158, 2021.

KRIDTAYOPAS, C. et al. Effect of prebiotic and synbiotic supplementation in diet on growth performance, small intestinal morphology, stress, and bacterial population under high stocking density condition of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4595–4605, 1 out. 2019.

LEE, A. et al. The effect of *Candida famata* and *Lactobacillus plantarum* on the number of coliforms and the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* in the gut of broilers. **Animal**, v. 15, n. 8, p. 100310, 2021.

LIU, H. N. et al. Effects of dietary supplementation of quercetin on performance, egg quality, cecal microflora populations, and antioxidant status in laying hens. **Poultry Science**, v. 93, n. 2, p. 347–353, fev. 2014.

MARIA CARDINAL, K. et al. Withdrawal of antibiotic growth promoters from broiler diets: performance indexes and economic impact. **Poultry Science**, v. 98, n. 12, p. 6659–6667, 1 dez. 2019.

MELLATA, M. **Escherichia coli** patogenicidade extra-intestinal humana e aviária: infecções, riscos zoonóticos e tendências de resistência a antibióticos. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 10, nº 11, 2013.

MENTEN, J.F.M; LONGO, F.A; VIOLA, E.S; RIZZO, P.V. **Antibióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais na nutrição de monogástricos**. *Nutrição de não ruminantes*. v. 4, n.6, p. 513 - 528. 2014.

MÍN, Y.N; YANG, H.L; XU, Y.X; GAO, Y.P; **Effects of dietary supplementation of synbiotics on growth performance, intestinal morphology, sIgA content and antioxidant capacity in broilers**. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. March. 2016.

MUAZ, K. et al. **Antibiotic residues in chicken meat: Global prevalence, threats, and decontamination strategies: A review** *Journal of Food Protection* International Association for Food Protection, , abr. 2018.

NHUNG, N. T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; CARRIQUE-MAS, J. J. **Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review** *Frontiers in Veterinary Science* Frontiers Media S.A., , 10 ago. 2017. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 18 jun. 2021

NOOREH, Z. et al. Effects of a dietary direct-fed microbial and *Ferulago angulata* extract on growth performance, intestinal microflora, and immune function of broiler chickens infected with *Campylobacter jejuni*. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, p. 100942, 1 mar. 2021.

NORDSTRÖM, R. et al. Membrane interactions of microgels as carriers of antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 513, p. 141–150, 2018.

OLADOKUN, S.; ADEWOLE, D. I. **In ovo delivery of bioactive substances: an alternative to the use of antibiotic growth promoters in poultry production— a review** *Journal of Applied Poultry Research* Elsevier Inc., , 1 set. 2020.

OLNOOD, C. G. et al. Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 184–191, 2015.

PALAMIDI, I.; MOUNTZOURIS, K. C. Diet supplementation with an organic acids-based formulation affects gut microbiota and expression of gut barrier genes in broilers. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 367–377, 1 dez. 2018.

PARK, K. W. et al. Effect of dietary available phosphorus and organic acids on the performance and egg quality of laying hens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 3, p. 598–604, 1 out. 2009.

PELUSIO, N. F. et al. Effects of increasing dietary level of organic acids and nature-identical compounds on growth, intestinal cytokine gene expression and gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at normal and high temperature. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 107, n. PA, p. 324–335, 2020.

PYNE, S. et al. Green microalgae derived organic nanodots used as food preservative. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, n. December 2021, p. 100276, 2022.

RAZA, A.; BASHIR, S.; TABASSUM, R. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. **Heliyon**, v. 5, n. 4, p. e01437, 2019.

REHMAN, A. et al. Dietary effect of probiotics and prebiotics on broiler performance, carcass, and immunity. **Poultry Science**, v. 99, n. 12, p. 6946–6953, 1 dez. 2020.

RICKE, S. C. **Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials**. Poultry Science. **Anais...Poultry Science Association**, 2003.

ROBERTSON, I. D. Disease Control, Prevention and On-Farm Biosecurity: The Role of Veterinary Epidemiology. **Engineering**, v. 6, n. 1, p. 20–25, 2020.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2011. v. 1.

SALIU, E. M.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. **Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry** **Animal Health Research Reviews** Cambridge University Press, , 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.>>. Acesso em: 18 jun. 2021

SEOK, J. H.; HA, J. W. Synergistic mechanism and enhanced inactivation exhibited by UVA irradiation combined with citric acid against pathogenic bacteria on sliced cheese. **Food Control**, v. 124, p. 107861, 1 jun. 2021.

SHARMA, R. et al. Microbial and functional feed supplement to improve livestock and poultry productivity with special reference to synbiotics: A review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 7, p. 62–68, 2018.

SKRIVANOVA, E. et al. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. **Veterinarni Medicina**, v. 51, n. 3, p. 81–88, 2007.

SKRIVANOVÁ, E. et al. Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 367–371, 2011.

ŚMIAŁEK, M.; KOWALCZYK, J.; KONCICKI, A. Influence of vaccination of broiler chickens against *Escherichia coli* with live attenuated vaccine on general properties of *E. coli* population, IBV vaccination efficiency, and production parameters—a field experiment. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 5452–5460, 1 nov. 2020.

SONG, Y. et al. Prevalence and characteristics of multidrug-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates from broiler chickens in Tai'an, China. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 1117–1123, 1 fev. 2020.

SOOMRO, R. N. et al. Impact of restricting feed and probiotic supplementation on growth performance, mortality and carcass traits of meat-type quails. **Animal Science Journal**, v. 90, n. 10, p. 1388–1395, 1 out. 2019.

SUMMERS, J.; TURNER, B.; TILLMAN, N. Effects of feeding a probiotic blend on live performance of broiler chickens from 0 to 49 days of age. *Journal of Applied Poultry Research*, v.31, n. 3, 2022.

TALTAVULL, N. et al. marine drugs Effects of Fish Oil and Grape Seed Extract Combination on Hepatic Endogenous Antioxidants and Bioactive Lipids in Diet-Induced Early Stages of Insulin Resistance in Rats. [s.d.].

THOMRONGSUWANNAKIJ, T. et al. Molecular and phenotypic characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from commercial broilers and native chickens. **Poultry Science**, v. 101, n. 1, p. 101527, 2022.

TOLDRA, F.; REIG, M. Growth Promoters: Characteristics and Determination. **Encyclopedia of Food and Health**, v. 1, p. 266–269, 1 jan. 2016.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4 suppl, p. 1097–1104, 2007.

WALSH, C. Antibióticos: ações, origens, resistência. Harvard Medical School. Boston, Massachusetts, EUA, 2003.

WANG, H. et al. Effects of encapsulated essential oils and organic acids on laying performance, egg quality, intestinal morphology, barrier function, and microflora count of hens during the early laying period. **Poultry Science**, v. 98, n. 12, p. 6751–6760, 2019.

WEN, J. et al. Changes of the mice intestinal microbes by the oligosaccharides-enriched fermented milk in a gender-dependent pattern. **Food Research International**, v. 140, n. October 2020, p. 110047, 2021.

WOLFENDEN, A. D. et al. Effect of Organic Acids and Probiotics on *Salmonella*

enteritidis Infection in Broiler Chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 6, p. 403–405, 2007.

ZHANG, L. Y. et al. Effects of oregano essential oil as an antibiotic growth promoter alternative on growth performance, antioxidant status, and intestinal health of broilers. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, 2021.

## ANEXO 1 – COMPROVANTE CEUA



**UDESC**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DE  
SANTA CATARINA

**LAGES**  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de compostos comerciais alternativos a antibióticos sobre o desempenho de frangos de corte desafiados por *Escherichia coli*.", protocolada sob o CEUA nº 9212210721 (10.001401), sob a responsabilidade de **Marcel Manente Boiago** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 23/07/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of alternative commercial compounds to antibiotics on the performance of broiler chickens challenged by *Escherichia coli*.", utilizing 630 Birds (630 males), protocol number CEUA 9212210721 (10.001401), under the responsibility of **Marcel Manente Boiago** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 07/23/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 09/2021 a 12/2021      Área: Zootecnia

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais		
Espécie:	Aves	sexo:	Machos
		idade:	1 a 42 dias
Linhagem:	Ross	N:	630
		Peso:	40 a 3500 g

Local do experimento: O experimento será realizado no aviário experimental para frangos de corte da Fazenda Experimental do Centro de Ensino Superior do Oeste (FECEO), localizada no município de Guatambu.

Lages, 11 de julho de 2022

José Cristani  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina