

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



Tese

***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em dietas para frangos de corte**

**Paola de Freitas Feltrin**

Pelotas, 2021.

**Paola de Freitas Feltrin**

***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em dietas para frangos de corte**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Área do conhecimento: Nutrição Animal).

Orientador: Professor Dr. Victor Fernando Büttow Roll  
Co-Orientadora: Dra. Aline Arassiana Piccini Roll

Pelotas, 2021.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

F329b Feltrin, Paola de Freitas

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em dietas para frangos de corte / Paola de Freitas Feltrin ; Victor Fernando Büttow Roll, orientador ; Fabio Leivas Leite, Aline Arassiana Piccini Roll, coorientadores. — Pelotas, 2021.

65 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Frangos de corte. 2. Nutrição animal. 3. Hematologia. 4. Túbulos seminíferos. 5. Vilosidades. I. Roll, Victor Fernando Büttow, orient. II. Leite, Fabio Leivas, coorient. III. Roll, Aline Arassiana Piccini, coorient. IV. Título.

CDD : 636.51

Paola de Freitas Feltrin

***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em dietas para frangos de corte**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/08/2021

Banca Examinadora:

---

Professor Victor Fernando Büttow Roll (Orientador). Doutor em Produção Animal pela Universidade de Zaragoza.

---

Professor Antônio Sérgio Varela Júnior. Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande.

---

Professor Eduardo Gonçalves Xavier. Ph.D. em *Animal Science* pela Universidade de Kentucky.

---

Professor Fabio Pereira Leivas Leite. Ph.D. em *Veterinary Science* pela Universidade de Madison.

---

Professor Fernando Rutz. Ph.D. em *Animal Science* pela Universidade de Kentucky.

Aos meus pais e irmão, pelo exemplo,  
incentivo, amor, carinho.  
**Dedico.**

## **Agradecimentos**

A Deus, pelo dom da vida, por me permitir chegar até aqui, por guiar meus pensamentos e mostrar o caminho a seguir.

Aos meus pais Antônio Moacir e Ivone, e ao meu irmão Everson, por acreditarem em mim e sempre que preciso me ampararem e incentivarem, principalmente durante minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao meu namorado Josias, por entender o período de ausência enquanto residi em Pelotas, por me incentivar e motivar sempre que foi preciso.

A minha cunhada Camilla, por sempre me dar força e estar disposta a ajudar sempre que preciso.

Ao professor Victor Roll, por ter aceitado me orientar no doutorado, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e por todo o apoio nessa etapa. Ao professor Fábio Leite, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo apoio. A Aline Roll, por confiar a mim parte do seu trabalho de pós-doutorado e por todo apoio. Aos professores Eduardo Xavier, Fernando Rutz, Ana Paula Nunes e Antônio Sérgio pelas contribuições, ensinamentos e apoio.

A Camila Von Müllen pela amizade e por toda ajuda ao longo do experimento, saiba que a tua ajuda foi de grande importância.

A todos os integrantes do GEASPEL, pela ajuda durante o período experimental.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade de cursar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos,

Muito Obrigada!

*“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.”*

**Eleanor Roosevelt**

## Resumo

FELTRIN, Paola de Freitas. ***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em dietas para frangos de corte.** 2021. 65f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Através do presente estudo avaliou-se o efeito da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, sobre o desempenho, rendimento de órgãos e carcaça, qualidade da carne, morfometria intestinal, parâmetros hematológicos e morfometria de túbulos semíniferos de frangos de corte. O experimento foi conduzido no biotério do Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Prof. Dr. Renato Rodrigues Peixoto – UFPEL/ Pelotas -RS, Brasil. Um total de 288 frangos de corte machos e fêmeas com um dia de idade da linhagem *Cobb* foram alojados em boxes. As aves foram distribuídas ao acaso em quatro tratamentos, com 12 repetições de 6 aves cada. Os tratamentos consistiam na suplementação ou não com o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), em cada sexo. Foi utilizado um programa alimentar considerando as fases: inicial, crescimento e final. O *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* foi adicionado às dietas na quantidade de  $1 \times 10^8$  UFC por g de ração, diariamente, por 42 dias. Para as avaliações de desempenho foram consideradas as variáveis: ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. Para as avaliações de rendimento de órgãos e carcaça, qualidade da carne, morfometria intestinal e parâmetros hematológicos, foram eutanasiadas aos 42 dias de idade, 12 aves por tratamento representando a média do boxe. Para a morfometria dos túbulos semíniferos foram coletados testículos dos machos eutanasiados aos 42 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* ( $P \leq 0,05$ ). Frangos de corte machos obtiveram maior ganho de peso nos períodos de 1 a 21 dias (701 g), de 21 a 42 dias (1496 g) e de 1 a 42 dias (2197 g), maior consumo de ração de 1 a 21 dias (1038 g), de 21 a 42 dias (2735 g) e de 1 a 42 dias (3773 g). Apresentaram melhor de conversão alimentar de 1 a 21 dias (1,49). Aos 42 dias obtiveram maior peso do fígado (38,2 g), maior peso vivo (2319 g), maior peso de coxa (116,6 g), maior peso de sobrecoxa (132 g) e maior percentagem de perda por cocção (29,4%). Foi observada interação significativa entre Bti:Sexo para a variável perda por cocção ( $P < 0,05$ ), onde os machos não suplementados apresentaram maior perda (31,2%) e as fêmeas não suplementadas a menor (25,9%). Também foi observada interação significativa entre Bti:Sexo para a variável b\*pele ( $P < 0,05$ ), onde o uso do Bti produziu menor b\*pele nos machos (20,5) e maior nas fêmeas (24,0). O grupo suplementado com Bti apresentou menor profundidade de cripta do duodeno quando comparado com o grupo não suplementado (684 vs 762  $\mu\text{m}$ ;  $P < 0,05$ ). A inclusão do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* nas dietas de frangos de corte, não melhorou as variáveis de desempenho, rendimento de órgãos e carcaça, qualidade da carne, parâmetros hematológicos e morfometria de túbulos semíniferos. Na morfometria intestinal proporcionou redução na profundidade de cripta do duodeno.

**Palavras-chave:** desempenho; hematologia; probiótico; túbulos seminíferos; vilosidades

## Abstract

FELTRIN, Paola de Freitas. ***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in broiler diets**. 2021. 65p. Thesis (Doctor of Science) – Graduate Program of Animal Science, Department of Animal Science, College of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Through the present study, was evaluated the effect of supplementation with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, on the performance of organs and carcass, meat quality, intestinal morphometry, hematological parameters and morphometry of seminiferous tubules of broiler chickens. The experiment was conducted in the bioterium of the Laboratory of Zootechnical Teaching and Experimentation Prof. Dr. Renato Rodrigues Peixoto – UFPEL/Pelotas -RS, Brazil. A total of 288 one-day-old male and female Cobb strain broilers were housed in boxes. The birds were randomly distributed into four treatments, with 12 replicates of six individuals each. The treatments consisted of supplementation or not with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), in each gender. A food program was used considering the phases: initial, growth and final. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* was added to the diets in the amount of  $1 \times 10^8$  CFU per gram of feed, daily, for 42 days. For performance evaluations, the following variables were considered: weight gain, feed intake and feed conversion. For the evaluations of organ and carcass yield, meat quality, intestinal morphometry and hematological parameters, 12 birds per treatment were euthanized at 42 days of age, representing the boxing average. For the morphometry of the seminiferous tubules, male testicles were collected from individuals euthanized at 42 days. Data were submitted to analysis of variance and means were compared using Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). Male broilers obtained greater weight gain in the periods from 1 to 21 days (701 g), from 21 to 42 days (1496 g) and from 1 to 42 days (2197 g), higher feed intake from 1 to 21 days (1038 g), from 21 to 42 days (2735 g) and from 1 to 42 days (3773 g). They showed better feed conversion from 1 to 21 days (1.49). At 42 days, they had higher liver weight (38.2 g), higher live weight (2319 g), higher thigh weight (116.6 g), higher drumstick weight (132 g) and higher percentage of cooking loss (29.4%). There was a significant interaction between Bti:Gender for the cooking loss variable ( $P < 0.05$ ), where non-supplemented males had the highest loss (31.2%) and non-supplemented females the lowest (25.9%). A significant interaction was also observed between Bti:Gender for the variable b\*skin ( $P < 0.05$ ), where the use of Bti produced lower b\*skin in males (20.5) and higher in females (24.0). The Bti-supplemented group had a lower duodenal crypt depth when compared to the non-supplemented group (684 vs 762  $\mu\text{m}$ ;  $P < 0.05$ ). The inclusion of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in broiler diets did not improve performance variables, organ and carcass yield, meat quality, hematological parameters and seminiferous tubule morphometry. In intestinal morphometry, it provided a reduction in duodenal crypt depth.

**Key-words:** performance; hematology; probiotic; seminiferous tubules; villi

## Lista de Tabelas

### **Capítulo 2 – Efeitos da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em frangos de corte**

|                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição dos tratamentos experimentais.....                                                                                                                                                                                                   | 27 |
| <b>Tabela 2.</b> Composição centesimal e perfil nutricional das dietas experimentais.....                                                                                                                                                                        | 28 |
| <b>Tabela 3.</b> Ganho de peso (GP), Consumo de ração (CR) e Conversão alimentar (CA) de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti) nos períodos de 1-21 dias, 21-42 dias e 1-42 dias.....   | 33 |
| <b>Tabela 4.</b> Peso dos órgãos de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti).....                                                                                                          | 34 |
| <b>Tabela 5.</b> Peso vivo, carcaça eviscerada e rendimento de carcaça de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti).....                                                                    | 35 |
| <b>Tabela 6.</b> Peso dos cortes de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti).....                                                                                                          | 36 |
| <b>Tabela 7.</b> pH, capacidade de retenção de água (CRA), perda por cocção (PC), perda por gotejamento (PG) e força de cisalhamento (FC) da carne de frangos machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti)..... | 37 |
| <b>Tabela 8.</b> Cor da carne de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti).....                                                                                                             | 38 |
| <b>Tabela 9.</b> Análise histológica do duodeno de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti).....                                                                                           | 39 |

### **Capítulo 3 - Parâmetros hematológicos e morfometria dos túbulos seminíferos de frangos de corte suplementados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição dos tratamentos experimentais.....                                                                                                | 45 |
| <b>Tabela 2.</b> Composição centesimal e perfil nutricional das dietas experimentais.....                                                                     | 46 |
| <b>Tabela 3.</b> Valores hematológicos de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti)..... | 48 |
| <b>Tabela 4.</b> Morfometria (diâmetro e espessura epitelial) dos túbulos seminíferos                                                                         |    |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| dos testículos de frangos de corte suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti)..... | 49 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Sumário

|                                                                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução.....</b>                                                                                                                                                            | <b>13</b> |
| <b>Capítulo 1 - Revisão da Literatura.....</b>                                                                                                                                      | <b>15</b> |
| 1.1 Probióticos.....                                                                                                                                                                | 16        |
| 1.1.1 Mecanismos de ação dos probióticos.....                                                                                                                                       | 18        |
| 1.1.2 Utilização de probióticos em frangos de corte.....                                                                                                                            | 20        |
| 1.2. Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> .....                                                                                                                                      | 21        |
| 1.2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .....                                                                                                                   | 23        |
| <b>Capítulo 2 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em dietas para frangos de corte.....</b>                                                                      | <b>25</b> |
| 2.1 Introdução.....                                                                                                                                                                 | 26        |
| 2.2 Materiais e métodos.....                                                                                                                                                        | 27        |
| 2.2.1 Animais e tratamentos.....                                                                                                                                                    | 27        |
| 2.2.2 Programa Alimentar.....                                                                                                                                                       | 28        |
| 2.2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .....                                                                                                                   | 28        |
| 2.2.4 Variáveis analisadas.....                                                                                                                                                     | 29        |
| 2.2.4.1 Desempenho zootécnico.....                                                                                                                                                  | 29        |
| 2.2.4.2 Rendimento de órgãos, cortes e carcaça.....                                                                                                                                 | 29        |
| 2.2.4.3 Qualidade da carne.....                                                                                                                                                     | 30        |
| 2.2.4.4 Morfometria intestinal.....                                                                                                                                                 | 30        |
| 2.2.5 Análise estatística.....                                                                                                                                                      | 31        |
| 2.3 Resultados e Discussão.....                                                                                                                                                     | 31        |
| 2.4 Conclusões.....                                                                                                                                                                 | 40        |
| <b>Capítulo 3 - Parâmetros hematológicos e morfometria dos túbulos seminíferos de frangos de corte suplementados com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.....</b> | <b>42</b> |
| 3.1 Introdução.....                                                                                                                                                                 | 43        |
| 3.2 Materiais e métodos.....                                                                                                                                                        | 44        |
| 3.2.1 Animais e tratamentos.....                                                                                                                                                    | 44        |
| 3.2.2 Programa alimentar.....                                                                                                                                                       | 45        |
| 3.2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .....                                                                                                                   | 45        |
| 3.2.4 Variáveis analisadas.....                                                                                                                                                     | 46        |
| 3.2.4.1 Parâmetros hematológicos.....                                                                                                                                               | 46        |
| 3.2.4.2 Morfometria dos túbulos seminíferos.....                                                                                                                                    | 47        |
| 3.2.5 Análise estatística.....                                                                                                                                                      | 47        |
| 3.3 Resultados e discussão.....                                                                                                                                                     | 47        |

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| 3.4 Conclusões.....                | 50        |
| <b>4 Considerações Finais.....</b> | <b>51</b> |
| <b>Referências.....</b>            | <b>52</b> |

## 1 Introdução

A avicultura brasileira teve seu desenvolvimento expandido nas últimas décadas, sendo que na região sul do Brasil encontram-se os principais polos de produção de frangos de corte. Atualmente o Brasil é reconhecido como o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo. O abate de frangos no 1º trimestre de 2021 totalizou 1,57 bilhão de cabeças, novo recorde na série histórica iniciada em 1997 (IBGE, 2021). O alto nível de desenvolvimento do setor avícola pode estar relacionado a fatores como genética, sanidade, nutrição e avanço da tecnologia de manejo. Esses fatores possibilitaram a produção de frangos mais pesados em um curto período de tempo e redução no consumo de ração, ajudando a indústria a atingir o cenário atual (VOGADO et al, 2016).

A produção de pintos comerciais em sistema de incubação altamente higiênico e controlado tem contribuindo para o desenvolvimento da avicultura brasileira, mas tem atrasado o estabelecimento da microbiota intestinal desses animais (DOMINGUES et al, 2014). Dessa forma, os frangos acabam ficando suscetíveis à infecção por microrganismos patogênicos, prejudicando seu desempenho produtivo e podendo desenvolver doenças intestinais e respiratórias, o que indica a necessidade do uso de aditivos benéficos à microbiota intestinal (DALÓLIO et al, 2015). Antibióticos foram usados por muito tempo na produção animal, como forma de tratamento, ou como potencializador de propriedades benéficas no desenvolvimento animal, visando o aumento da produtividade (KURITZA et al, 2014). No entanto, a proibição do uso de antibióticos subterapêuticos em vários países e as preocupações dos consumidores sobre a segurança alimentar e bactérias resistentes aos antibióticos em humanos, trouxeram desafios para a eficiência da produção da indústria avícola (POURAKBARI et al, 2016).

Neste sentido, alternativas ao uso de antibióticos estão em constante desenvolvimento na área de pesquisa, e dentre elas está o uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. Muitos são os conceitos atribuídos aos probióticos. Atualmente, a instrução normativa 44 de 15/12/2015 emitida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abatecimento define probióticos como cepas de microrganismos vivos (viáveis), que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestório dos animais, contribuindo para o seu equilíbrio (BRASIL, 2015). Os probióticos possuem diferentes mecanismos de ação, destacando-se, a

exclusão por competição, o antagonismo direto, a estimulação do sistema imunológico, o efeito nutricional e a redução da produção de amônia (REIS & VIEITES, 2019). Eles também melhoram a utilização dos alimentos, e ajudam a reduzir a excreção de nutrientes (TRALDI et al., 2007). O melhor uso dos alimentos faz com que os animais produzam mais carne, sem ter que consumir mais ração ou atingir à idade de abate mais rapidamente (DOMINGUES et al, 2014). Vários microrganismos são utilizados como probióticos, incluindo as bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido láticas e leveduras (COPPOLA & TURNES, 2004), e de acordo com Reis & Vieites (2019) os principais microrganismos utilizados são dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e também leveduras, podendo ser utilizados individualmente ou em associação entre eles.

Esporos de *Bacillus* sp. são amplamente utilizados como probióticos e agentes de exclusão competitiva em humanos e animais, o que os diferencia de outras espécies de microrganismos utilizadas que se encontram em sua forma vegetativa (WULFF, 2015). Além disso, eles produzem várias enzimas extracelulares que aumentam a digestibilidade dos alimentos, bem como muitos compostos antimicrobianos. A espécie também estimula o sistema imunológico dos animais hospedeiros, melhorando assim o desempenho de crescimento, a taxa de conversão alimentar e a qualidade da carne (LEE et al, 2012). O *Bacillus* mais conhecido é o *Bacillus cereus*, mas além dele, outras espécies têm sido utilizadas como probióticos, como *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. thuringiensis*, dentre outras (HONG et al, 2005).

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, pertence à família *Bacillaceae*, é um bastonete Gram-positivo, esporulante, aeróbico não estrito, entomopatogênico e destaca-se como a principal bactéria utilizada no controle biológico (ANGELO et al, 2010). Cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas são de produtos à base dessa bactéria (VILAS BÔAS et al, 2007). Entretanto, suas propriedades probióticas ainda não estão bem descritas, sendo de extrema importância avaliar sua ação em frangos de corte, para avanço no tratamento sustentável dos animais e diminuição na utilização de produtos de origem de síntese química. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, sobre o desempenho, rendimento de órgãos e carcaça, qualidade da carne, morfometria intestinal, parâmetros hematológicos e morfometria dos túbulos seminíferos de frangos de corte.

## Capítulo 1

---

Revisão de Literatura

## 1.1 Probióticos

Nas últimas décadas o desenvolvimento da avicultura brasileira foi expandido, e seu alto nível de desenvolvimento pode estar relacionado a fatores como genética, sanidade, nutrição e avanço da tecnologia de manejo. Esses fatores possibilitaram a produção de frangos mais pesados em um curto período de tempo e redução no consumo de ração, ajudando a indústria a atingir o cenário atual (VOGADO et al, 2016). Embora seja uma atividade vantajosa, a produção de frangos de corte enfrenta como maior desafio problemas sanitários. Além disso, com o surgimento das criações intensivas e dos pintinhos não terem contato prévio com a microbiota natural, os frangos estão sujeitos a enfermidades durante a eclosão, o que indica a necessidade do uso de aditivos benéficos a microbiota intestinal (DALÓLIO et al, 2015).

Há muito tempo, os antibióticos têm sido amplamente utilizados na produção animal, seja como forma de tratar infecções bacterianas do trato gastrointestinal, seja como potencializador de desempenho benéfico ao desenvolvimento animal, visando aumento de produtividade (KURITZA et al, 2014). No entanto, o uso de antibióticos para melhorar o desempenho do mesmo grupo de drogas terapêuticas, propiciou o surgimento de cepas resistentes que são prejudiciais à saúde e ao tratamento de animais e humanos (EDENS, 2003). Esse fato, atraiu a atenção de pesquisadores, grupos radicais e autoridades governamentais envolvidas com a saúde pública, clamando pela retirada de antibióticos como promotores de crescimento na indústria avícola (HALPHIDE, 2003). Autoridades como a Organização Internacional de Saúde e a Food and Drug Administration (FDA) tem se preocupado com dietas de animais contendo antibióticos desde 1960, e países desenvolvidos estabeleceram diretrizes rígidas para o uso destas substâncias desde 1980. No Brasil, o Ministério da Agricultura proibiu o uso de muitos antibióticos na alimentação animal, desde 1990 (MENTEN, 2002). A União Europeia em reunião do conselho em fevereiro de 2003, decidiu que entraria em vigor a proibição da utilização de antibióticos como promotores de crescimento a partir de janeiro de 2006. A proibição apelava à cessação da utilização continuada destes antibióticos na produção de carnes, principalmente carne de frango (COUNCIL, 2003).

Atualmente os consumidores estão se tornando cada vez mais rigorosos, exigindo que a carne produzida não use antibióticos. Segundo Raposo et al, (2019), o Brasil, como grande produtor e exportador de carne de frango, sempre cumpriu a

maioria das exigências estabelecidas pelos blocos comerciais, portanto, continuamente revisa sua regulamentação sobre o uso de antibióticos. Devido às preocupações dos consumidores sobre a segurança alimentar e com bactérias resistentes aos antibióticos em humanos, e a proibição em alguns países do uso de antibióticos subterapêuticos, trouxeram desafios para a eficiência produtiva da indústria avícola (POURAKBARI et al, 2016). Nos últimos anos, muitas alternativas aos antibióticos têm sido estudadas, entre os quais os probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, enzimas, imunoestimulantes, fitoterápicos e medicamentos são os mais proeminentes.

O termo probiótico foi definido pela primeira vez como sendo um fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos (LILLY & STILLWELL, 1965). Parker (1974), os definiu como organismos ou substâncias que contribuem para um balanço intestinal adequado. Para Crawford (1979), os probióticos podem ser definidos como uma cultura de microrganismos vivos específicos que são implantados no trato digestivo de animais por meio da alimentação para garantir o estabelecimento efetivo das populações microbianas intestinais e o melhor uso dos alimentos. Fuller (1989) e Kaur et al, (2002), os definiram como suplementos alimentares de microrganismos vivos, que beneficiam a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal. Schrezenmeir & De Vrese (2001) acreditam que o termo probiótico deve ser usado para se referir a preparações ou produtos que contêm certos microrganismos vivos e em número suficiente. Esses microrganismos alteram a microbiota da mucosa através da colonização do sistema do hospedeiro e têm efeito benéfico sobre a sua saúde. Atualmente, a instrução normativa 44 de 15/12/2015 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento define probióticos como cepas de microrganismos vivos (viáveis), que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestório dos animais, contribuindo para o seu equilíbrio (BRASIL, 2015). Independentemente da definição utilizada, os probióticos conferem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não induzem resistência (NEPOMUCENO & ANDREATTI, 2000), tornando-os candidatos adequados para substituir os antibióticos como aditivos alimentares.

Para Szajewska et al, (2006), para ser classificado como probiótico, o organismo deve: ser não patogênico; ser resistente ao tratamento; estabilizar e manter a viabilidade após exposição aos sucos digestivos; aderir à células epiteliais; poder

persistir no trato gastrointestinal e ser capaz de afetar a atividade metabólica local. Além das propriedades mencionadas, os probióticos devem ser seguros, manter-se viáveis durante armazenamento e transporte, ser tolerantes a baixos valores de pH do suco gástrico e resistentes a bile, secreções pancreáticas e intestinais, não carregar genes para transmissão de resistência, ter propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas e resistir a fagos e ao oxigênio (HAVENAAR et al., 1992; SALMINEN et al., 1998; OUWEHAND et al., 1999; SAARELA et al., 2000; HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002). Vários microrganismos são utilizados como probióticos, incluindo as bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido láticas e leveduras (COPPOLA & TURNES, 2004), e de acordo com Reis & Vieites (2019) os principais microrganismos utilizados são dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e também leveduras, podendo ser utilizados individualmente ou em associação entre eles.

### **1.1.1 Mecanismos de ação dos probióticos**

O modo de ação dos probióticos não foi totalmente compreendido, embora vários processos que podem atuar de forma independente ou em combinação tenham sido propostos. Dentre eles, os principais são: exclusão competitiva, antagonismo direto, estimulação do sistema imunológico, efeitos nutricionais e redução da produção de amônia (REIS & VIEITES 2019). O conceito de exclusão competitiva surgiu com Nurmi e Rantala (1973), para designar a incapacidade de uma população microbiana se formar no intestino devido à presença de outra população. Eles observaram que pintinhos nascidos em condições sanitárias estritas, eram privados de microrganismos que colonizariam naturalmente seu trato digestivo e, quando inoculados com conteúdo intestinal diluído de aves adultas, tinham um efeito protetor de 77% contra *Salmonella* infantis.

As bactérias probióticas formam uma barreira física às bactérias patogênicas ocupando sítios de ligação no eptélio intestinal e são excluídas competitivamente. Além do efeito físico, exercem efeito biológico, promovendo um ambiente de baixa tensão de oxigênio, desfavorecendo o crescimento de bactérias enteropatogênicas. Também exercem efeito químico, pois produzem ácidos orgânicos, que baixam o pH do intestino, inibindo bactérias patogênicas (PETRI, 2000; GHADBAN, 2002).

A produção e liberação de bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxidos de

hidrogênio pelas bactérias intestinais e/ou dos probióticos, que tenham ação contra bactérias patogênicas, caracterizam o mecanismo de antagonismo direto (PETRI, 2000). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos de ação local, que inibem o crescimento de patógenos entéricos e não induzem a morte celular (GHADBAN, 2002). Quando produzidas por bactérias ácido-láticas inibem o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas (FERREIRA e ASTOLFI-FERREIRA, 2006). Além disso, a produção de ácido (acético, propiônico, butírico, láctico), pode inibir o crescimento de patógenos por baixar o pH, ou por afetar diretamente as bactérias (LEEDLE, 2000).

A modulação da resposta imune ocorre pelo aumento do número e da atividade das células fagocíticas no hospedeiro por bactérias probióticas (FERREIRA e ASTOLFI-FERREIRA, 2006). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão diretamente envolvidos na estimulação da resposta imune pelo aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon, entretanto, este mecanismo permanece pouco compreendido (FLEMMING & FREITAS, 2005). O trato digestivo das aves têm a maior responsabilidade no desenvolvimento da imunidade, uma vez que esses animais não apresentam gânglios linfáticos (TOURNOUT, 1998). Com a imunoestimulação da mucosa, são produzidos anticorpos do tipo IgA que atuam bloqueando os receptores e reduzindo o número de bactérias patogênicas no lúmen do intestino (LODDI et al, 2001). A atividade microbiana gerada pelos probióticos, junto com o rápido trânsito do processo digestivo, pode ser eficaz no aumento do desempenho. Além disso, um aumento na digestão ou absorção pode ser observado quando as bactérias lácticas reduzem o pH no intestino, o que ajuda a absorver mais ácidos de cadeia curta (LEEDLE, 2000).

A melhor ou pior capacidade de ocupação do intestino pelas bactérias probióticas pode ser determinada pela via de administração. Ainda não está claro qual a melhor forma de aplicá-los, mas independente da via, eles devem ser usados em aves o mais antecipadamente possível. Podem ser utilizados incorporados à ração, água, aspergidos nas aves ou na cama utilizada, inoculados em ovos embrionados, em cápsulas gelatinosas e via intra-esofágica (SILVA, 2000; ANDREATTI FILHO e SILVA, 2005).

### **1.1.2 Utilização de probióticos em frangos de corte**

O sistema digestivo da ave recém eclodida é anatomicamente completo, mas as funções digestivas e de absorção da ave são imaturas. Os pintinhos usam as reservas do corpo para atingir um rápido desenvolvimento físico e funcional do trato gastrointestinal, para digerir alimentos e absorver nutrientes (UNI & FERKET, 2004). A microbiota se estabelece durante os primeiros dias de vida de uma ave. Onde há aumento considerável no número de bactérias a partir dos quatro dias de idade, que tende a estabilizar a partir da segunda semana de idade (CANALLI et al, 1996; MAIORKA, 2001). Para Fuller et al, (1960) as bactérias gastrointestinais têm grande influência no metabolismo, fisiologia e nutrição do hospedeiro, visto que existem aproximadamente  $10^9$  a  $10^{14}$  UFC /g de bactérias no intestino dos animais.

A produção de pintos comerciais em sistema de incubação altamente higiênico e controlado tem contribuindo para o desenvolvimento da avicultura brasileira, mas tem atrasado o estabelecimento da microbiota intestinal desses animais (DOMINGUES et al, 2014). Dessa forma, são sensíveis a microrganismos patogênicos, que podem afetar sua produtividade, e são susceptíveis ao desenvolvimento de doenças intestinais e respiratórias. Nesse sentido, o fornecimento de probióticos, deve ser realizado o mais cedo possível, para que as bactérias benéficas colonizem o trato gastrointestinal do hospedeiro, antes que o patógeno se torne ativo (SILVA & PINHEIRO, 2008).

Os resultados sobre o efeito do uso de probióticos nos índices de desempenho de frangos de corte ainda são contraditórios, apesar de muitos anos de evidências na literatura de seus benefícios para o desempenho destes animais. Para Silva (2000), essa variação nos resultados se deve ao fato de a maioria dos produtos comerciais não conter quantificação e composição microbiológica bem conhecidas. Além disso, uma série de fatores como a idade do animal, condições de armazenamento, condições de manejo e desafio sanitário podem afetar a eficácia dos probióticos (MACARI & FURLAN, 2005).

Quando administrados às aves aumentam a eficiência alimentar, melhoram a qualidade ao alimento, agem como promotores naturais do crescimento, reduzem as perdas devido a doenças infecciosas e os sintomas de estresse (KOZASA, 1989). Além disso, contribuem para maior ganho de peso, melhor conversão alimentar e maior rendimento de carcaça (BERTECHINI & HOSSAIN, 1993; JIN et al, 1998;

ABEDINI et al, 2017). Sen et al, (2012) e Bai et al, (2017), utilizando probióticos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus subtilis* fmbj observaram aumento no ganho de peso e melhora na taxa de conversão alimentar de frangos de corte. Já Marubashi et al, (2013) e Amerah et al, (2013) observaram uma melhora na conversão alimentar em frangos suplementados com um probiótico a base de *Bacillus subtilis*. Maruta (1993) observou ao utilizar probióticos com apenas uma cepa bacteriana, aumento no rendimento de carcaça e no rendimento do peito e diminuição da gordura abdominal em frangos. Resultados semelhantes foram encontrados por Junqueira et al, (2006) e Mokhtari et al, (2010). Porém nem sempre são observados efeitos benéficos na sua utilização. Para Loddi et al, (1998) a suplementação de probióticos não teve efeitos positivos sobre o ganho de peso ou a eficiência alimentar. Resultados semelhantes foram encontrados por Estrada et al, (2001) ao usar *Bifidobacterium bifidum* como probiótico; por Reyes et al, (2000) usando bactérias ácido-láticas ou láticas; e Domingues et al, (2014) com o uso de probiótico a base de *Bacillus subtilis*. Outros pesquisadores não verificaram o efeito da suplementação de probióticos no desempenho (SHARGH et al, 2012; NOSRATI et al, 2017) e nas características das carcaça de animais (DOMINGUES et al, 2014; SOUZA et al, 2018).

Manafi et al, (2018), relataram que após a administração de probióticos, houve aumento da altura das vilosidades e da relação vilosidade/profundidade da cripta, responsáveis pelo aumento no ganho de peso e eficiência por meio do aumento da digestão e absorção dos alimentos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Dong et al, (2020) quando *Bacillus subtilis* BYS2 foi adicionado a dieta de frangos de corte. Por outro lado, Souza et al, (2018) não observaram efeito de um probiótico a base de *Bacillus* na altura das vilosidades, porém, as aves suplementadas apresentaram menor profundidade de cripta no duodeno. Os benefícios do uso de probióticos em frangos de corte são bem conhecidos, porém, é necessário esclarecimento sobre a espécie e concentração de microrganismos que devem ser utilizados.

## **1.2 Bactérias do gênero *Bacillus***

O gênero *Bacillus* sp. incluiu microrganismos Gram-positivos, em forma de bastonete, formadores de endosporos, aeróbicos ou anaeróbicos que podem ser encontrados no solo, água, poeira e ar. As necessidades nutricionais para seu

crescimento são simples, exigindo certos aminoácidos ou vitaminas do complexo B (STANIER et al, 1969). Por não estarem naturalmente presentes na microbiota gastrointestinal, são considerados alóctones, com poucas espécies patogênicas. Além disso, por produzirem enzimas que degradam muitas substâncias orgânicas, apresentam poderosa atividade metabólica (FRANCO & LANDGRAF, 2002). Um número reduzido de cepas apresentam aplicações biotecnológicas diversas, como a produção de enzimas, aminoácidos, antibióticos, preparação de alimentos fermentados e controle biológico (NITHYA & HALAMI, 2012). Além de apresentarem, propriedades probióticas, como viabilidade no intestino (TAM et al, 2006), resistência ácida e aos sais biliares (HONG et al, 2005), sendo cada vez mais incorporadas em produtos alimentícios.

Espécies do gênero *Bacillus* apresentam vantagens em relação a outros microrganismos não esporulantes, tais como: 1) Podem sobreviver em alimentos que devem ser processados a alta temperatura e pressão; 2) Melhor sobrevivência em condições gastrointestinais; 3) Possuem longa vida útil e permanecem viáveis em temperatura ambiente ou refrigerada; e 4) Devido à sua melhor sobrevivência, a dose efetiva necessária para suplementação é menor (CUTTING, 2011; DURKEE, 2010; SOROKULOVA et al, 2008). Além disso, devido à sua natureza aeróbia e formação de endósporos, eles são capazes de sobreviver a estresses ambientais, incluindo armazenamento, transporte e processos de peletização, e são preferidos para uso na alimentação animal (SETLOW, 2006; CARTMAN et al, 2008; WU et al, 2011). Os produtos contendo endósporos de *Bacillus* são usados comercialmente como probióticos, contendo uma dose única de  $10^9$  esporos/g ou ml (MAZZA, 1994). Eles também podem atuar como conservantes em alimentos (BEAUMONT, 2002).

Pesquisas conduzidas ao longo dos anos, mostraram os efeitos benéficos do uso de cepas de *Bacillus* sp. em frangos de corte. Santoso et al, (1995), Fritts et al, (2000) e Cuevas et al, (2000), ao administrar *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* var. *toyoii* na ração de frangos de corte, observaram aumento no ganho de peso e melhora na conversão alimentar. Flemming et al, (2005) descobriram que o uso de probióticos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* pode melhorar o ganho de peso, conversão alimentar, o consumo de ração e a mortalidade de frangos de corte. Lora Graña (2006), também observou resultados positivos de ganho de peso de frangos de corte de 01 a 42 dias de idade ao comparar avilamicina com duas doses diferentes de probióticos a base de *Bacillus subtilis*. Lee et al, (2011), forneceram probióticos à base

de *Bacillus subtilis* e descobriram que, ao aumentar a síntese de óxido nítrico e sua ação fagocítica, estimula a atividade dos macrófagos, proporcionando assim uma resposta acelerada a quaisquer microorganismos estranhos que passam pelo trato gastrointestinal. Upadhaya et al, (2019), demonstraram uma redução nas emissões de NH<sub>3</sub> de excretas de aves suplementadas com *Bacillus subtilis*. Dong et al, (2020), observaram que o uso de *Bacillus subtilis* BYS2 pode promover uma profundidade de cripta mais rasa, resultando em vilosidades mais longas, maior área de superfície das vilosidades e células epiteliais mais absorptivas. Embora tenhamos um número razoável de culturas probióticas disponíveis para uso comercial, existem muito poucas cepas *Bacillus* sp. consideradas como tendo esse potencial.

### **1.2.1 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***

Desde o início do século XX, se dá a descoberta e o desenvolvimento comercial das bactérias entomopatogênicas *Bacillus thuringiensis*. Em 1902 Ishiwata, no Japão, relatou um esporo bacteriano que causou a morte de bichos-da-seda (*Bombix mori*). Berliner descreveu o mesmo tipo de bactéria agindo nas traças-das-farinhas (*Anagasta kuhniella*) na Alemanha em 1911, e foram denominadas *Bacillus thuringiensis* em 1915 (HABIB & ANDRADE, 1986). Goldberg & Margalit (1977), descobriram uma cepa de *Bacillus thuringiensis* que é eficaz contra insetos dípteros (culicídeos e simulídeos) em solo israelense, com alta eficácia larvicida, a qual foi chamada de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, com células vegetativas de 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento, e seus esporos são de forma oval (GORDON et al., 1973). Esta espécie não é estritamente aeróbica e sua temperatura de crescimento varia de 10 e 45 °C. A produção de cristais de proteína durante a esporulação o distingue de outras espécies do mesmo gênero. Esses cristais têm atividade entomopatogênica contra uma variedade de insetos (Lepidoptera, Diptera e Coleoptera). Cristais tóxicos para insetos Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phthiraptera e certos nematóides, protozoários e ácaros estão presentes em certas subespécies (BRAR et al, 2006; GLARE & O'CALLAGHAN, 2000; SCHNEPF et al, 1998).

Os cristais são formados principalmente por uma proteína chamada Cry (δ-endotoxinas). Têm atividade inseticida específica e geralmente são codificadas por

genes localizados em plasmídeos, mas raramente por genes localizados em cromossomos bacterianos (CRICKMORE et al, 2008). Para que uma proteína seja considerada Cry, ela deve formar um paraesporo (cristal), apresentar certo grau de toxicidade a insetos alvos, ou apresentar sequência de aminoácidos semelhante à já descrita proteína Cry (BRAVO et al, 2007). Também são sintetizadas proteínas chamadas Cyt, com atividade hemolítica que formam uma inclusão paraesporal de *Bacillus thuringiensis*, ou alguma proteína que apresente sequência de aminoácidos similar às proteínas Cyt já descritas (BRAVO et al, 2007, CRICKMORE et al, 2008). Ao final da esporulação, os cristais correspondem a aproximadamente 20 a 30% do peso seco das células e são liberados durante a lise celular (ARANTES et al, 2002; GLARE & O'CALLAGHAN, 2000). A formação de proteínas também ocorre durante a fase de crescimento vegetativo. Essas proteínas são chamadas de Vip (*vegetative insecticidal proteins*) e apresentam uma forma de intoxicação semelhante às proteínas Cry (CRICKMORE et al, 2008). Uma nova toxina, denominada de parasporina, que não tem atividade hemolítica, mas é capaz de atacar células cancerígenas em geral foi descrita em 2000 (OKUMURA et al, 2010).

O *Bacillus thuringiensis* é geralmente produzido por fermentação submersa intermitente (líquida), na qual o recipiente de meio de cultura líquido é inoculado com microrganismos, ocorrendo todo o desenvolvimento da cultura, sendo o produto retirado no final do processo (MORAES et al, 2001). A fermentação deve ser realizada a uma temperatura entre 28° e 38°C, com pH controlado em torno de 7,0, podendo durar de 24 a 72 horas (DIAS, 1992). Maldonado- Blanco et al, (2003) descobriram que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, melhorou a produção de proteínas Cry com agitação de 300 rpm e aeração de 1vvn ou 500 rpm e 0.06 vvn, com aproximadamente 26% de oxigênio. No final da fermentação a cultura contém em média 6 a 8% de sólidos, metade dos quais são esporos e cristais de proteínas, que podem ser recuperados por centrifugação ou microfiltração.

Devido à sua biologia, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* se destaca como a principal bactéria utilizada no controle biológico. No entanto, suas propriedades probióticas são pouco caracterizadas, sendo de extrema importância avaliar sua atividade em frangos de corte, para avanço no tratamento sustentável dos animais e diminuição na utilização de produtos de origem de síntese química.

## Capítulo 2

---

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em dietas para frangos de  
corte

## 2.1 Introdução

A conscientização e preferência dos consumidores de produtos avícolas, por produtos livres de resíduos químicos têm impulsionado o esforço global para identificar alternativas saudáveis e ecologicamente corretas para melhorar a saúde e o desempenho animal (WOLFENDEN et al, 2010). Entre essas alternativas, está o uso de probióticos, que são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades suficientes, produzem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (HILL et al, 2014; MANAFI, 2015). Além disso, probióticos adicionados à dieta que modificam a microbiota, seja por implantação ou colonização (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001), podem ser ativos na prevenção e tratamento de doenças como imunomoduladores, bem como estimulantes de crescimento em animais (COPPOLA & TURNES, 2004). Ademais, podem afetar a qualidade da carne dos animais em que são administrados (ZHOU et al, 2010).

A pesquisa nos últimos anos mostrou resultados promissores da suplementação de probióticos na dieta de frangos de corte, dentre eles, estão os *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Aspergillus* (LEMA et al, 2001; TANNOCK, 2001; ZHANG et al, 2005; CHEN et al, 2009, MANAFI & KHOSRAVINIA, 2013). Bactérias do gênero *Bacillus* sp. são esporulantes, termoestáveis e capazes de atravessar a barreira gástrica, utilizados na alimentação animal, suplementos alimentares humanos e medicamentos aprovados (CUTTING, 2011). Devido à sua natureza aeróbia e endospórica, são capazes de sobreviver a estresses ambientais, incluindo armazenamento, transporte e processos de peletização, sendo preferidos para uso na alimentação animal (SETLOW, 2006; CARTMAN et al, 2008; WU et al, 2011).

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) da família *Bacillaceae*, é uma bactéria Gram-positiva, esporulante, aeróbica não estrita, com temperatura de crescimento de 10 a 45°C, entomopatogênica e predominante como a principal bactéria utilizada no controle biológico. Por exibir a produção de cristais de proteína durante a esporulação, diferencia-se de outras espécies do mesmo gênero (ANGELO et al, 2010). Cerca de 90% do mercado global de bioinseticidas diz respeito a produtos à base dessa bactéria (VILAS BÔAS et al, 2007). Porém, por se tratar de um microrganismo amplamente utilizado e popular em biocontrole, suas propriedades

probióticas ainda não foram descritas, sendo necessários mais estudos para obtenção de resultados sobre sua eficácia na alimentação de frangos de corte.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, sobre o desempenho, rendimento de órgãos, cortes e carcaça, qualidade da carne e morfometria intestinal de frangos de corte machos e fêmeas.

## 2.2 Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no biotério do Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Prof. Dr. Renato Rodrigues Peixoto – UFPEL, conforme aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) UFPEL, sob o protocolo número 9053.

### 2.2.1 Animais e tratamentos

Um total de 288 pintos de corte de um dia (machos e fêmeas) da linhagem comercial Cobb foram alojados separados por sexo em boxes de 1m<sup>2</sup>, com cama de casca de arroz de 10 cm de altura, equipados com comedouros tubulares e bebedouros tipo *nipple*, aquecimento elétrico através de campânulas. O acesso a alimentação e água foi *ad libitum* por 42 dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos com 12 repetições de 6 aves cada uma (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição dos tratamentos experimentais.

| Tratamento | Suplementação                                         | Sexo  |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|
| 1          | Sem suplementação                                     | Macho |
| 2          | Sem suplementação                                     | Fêmea |
| 3          | <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> | Macho |
| 4          | <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> | Fêmea |

### 2.2.2 Programa alimentar

Foi utilizado um programa alimentar de três fases, sendo: inicial (1 até 20 dias), crescimento (21 até 35 dias) e final (36 até 42 dias). As dietas foram formuladas com base nos requerimentos da linhagem, e fornecidas fareladas, tendo a composição e o perfil nutricional descritos na Tabela 2. Não foram adicionadas as dietas nenhum antibiótico ou anticoccidiano durante o período experimental.

**Tabela 2.** Composição centesimal e perfil nutricional das dietas experimentais.

| Ingrediente (kg)                   | Dieta inicial*<br>(1-20 dias) | Dieta<br>crescimento**<br>(21-35 dias) | Dieta<br>terminação**<br>(36-42 dias) |
|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| Milho                              | 57.07                         | 61.05                                  | 64.41                                 |
| Farelo de soja                     | 38.03                         | 33.51                                  | 30.6                                  |
| Óleo                               | 2.5                           | 3.2                                    | 3.0                                   |
| Carbonato de cálcio                | 1.40                          | 1.33                                   | 1.20                                  |
| Sal                                | 0.43                          | 0.42                                   | 0.39                                  |
| L-Lisina                           | 0.164                         | 0.169                                  | 0.148                                 |
| DL-Metionina                       | 0.322                         | 0.256                                  | 0.192                                 |
| L-Treonina                         | 0.085                         | 0.065                                  | 0.060                                 |
| Total                              | 100.0                         | 100.0                                  | 100.0                                 |
| Composição calculada               |                               |                                        |                                       |
| Energia Metabolizável<br>(Kcal/Kg) | 2980                          | 3070                                   | 3100                                  |
| Proteína Bruta (%)                 | 20.8                          | 19.0                                   | 18.0                                  |
| Cálcio (%)                         | 0.95                          | 0.96                                   | 0.90                                  |
| Sódio (%)                          | 0.20                          | 0.19                                   | 0.18                                  |
| Fósforo disponível (%)             | 0.46                          | 0.41                                   | 0.41                                  |
| Met + Cys dig (%)                  | 0.95                          | 0.90                                   | 0.86                                  |
| Lisina dig (%)                     | 1.20                          | 1.05                                   | 0.98                                  |
| Treonina dig(%)                    | 0.85                          | 1324                                   | 1261                                  |

\*Concentrado: Colina 7.430 mg; Ácido fólico 127,76 mg; Vitamina E 311.72 UI; Vitamina K3 26,28 mg; Vitamina B2 85,41 mg; Vitamina B6 43,80 mg; Ferro 1.800 mg; Zinco 1.667 mg; Vitamina D3 38.180 UI; Vitamina A 172.170 UI; Vitamina B1 26,28 mg; Cobre 300 mg; Iodo 20 mg; Ácido Nicotínico 569,40 mg; Ácido Pantoténico 255,65 mg; Vitamina B12 222,20 mcg; Manganês 2.100 mg; Selênio 10 mg; Cálcio 247 g; Fósforo 110,57 g.

\*\*Concentrado crescimento: Colina (Min) 4.780 mg; Ácido fólico (Min) 58,56 mg; Vitamina E (Min) 365.85 UI; Vitamina K3 (Min) 25,18 mg; Vitamina B2 (Min) 80 mg; Vitamina B6 (Min) 44,36 mg; Ferro (Min) 1.800 mg; Zinco (Min) 1.667 mg; Vitamina D3 (Min) 25.182 UI; Vitamina A (Min) 110.040 UI; Vitamina B1 (Min) 24,27 mg; Cobre (Min) 300 mg; Iodo (Min) 20 mg; Ácido Nicotínico (Min) 482,34 mg; Ácido Pantoténico (Min) 226,35 mg; Vitamina B12 (Min) 203,85 mcg; Manganês (Min) 2.100 mg; Selênio (Min) 10 mg; Cálcio (Min) 221,7 g; Fósforo (Min) 98,70 g.

### 2.2.3 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

O *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) utilizado neste estudo faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Para a produção, Bti foi

semeado em meio BHI ágar (*Brain Heart Infusion*, Difco) e incubado por 24 horas à 28 °C. Após crescimento, colônias isoladas foram inoculadas em 200 mL de meio BHI e incubados em agitador orbital a 200 rpm durante 24 horas. Os cultivos foram inoculados em 4L de meio NYSM (*Nutrient Yeast Extract Salt Medium*) a 28 °C sob agitação (250 rpm) e aeração (1vvm), por 72 horas. As células foram recuperadas por centrifugação a 6000 × g por 20 min e concentrados em um volume final de 1 L de solução salina fosfatada (PBS). O Bti foi suplementado na quantidade de 1 × 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g de ração diariamente, durante 42 dias.

## **2.2.4 Variáveis analisadas**

### **2.2.4.1 Desempenho zootécnico**

As variáveis avaliadas foram: ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA), em três períodos: 1 a 21 dias; 21 a 42 dias e 1 a 42 dias. As aves foram pesadas no dia do alojamento (dia 1), e semanalmente ao longo do período experimental (até 42 dias). A ração fornecida e as sobras foram pesadas semanalmente para a obtenção do valor do consumo de ração e para o cálculo da conversão alimentar, que foi calculada através da fórmula abaixo:

$$CA = \frac{\text{Consumo de ração (g)}}{\text{Ganho de peso (g)}}$$

Aos 42 dias para avaliação do peso de órgãos, rendimento de carcaça, qualidade da carne e morfometria intestinal foram selecionados e eutanasiados 48 frangos, sendo 12 aves por tratamento com peso corporal representando a média do boxe.

### **2.2.4.2 Rendimento de órgãos, cortes e carcaça**

As aves foram evisceradas e as vísceras comestíveis (coração, fígado e moela) foram pesadas. A gordura abdominal foi constituída pelo tecido adiposo presente na região abdominal. As carcaças foram pesadas para separação dos cortes da coxa, sobrecoxa, coxinha da asa, ponta da asa, dorso e peito permanecendo todas as partes

com pele e ossos. Para determinação do peso dos cortes da coxa, sobrecoxa, coxinha da asa e ponta da asa, foram pesados o lado direito e esquerdo e obtida a média. O rendimento de carcaça depenada, eviscerada, sem pés, cabeça e pescoço foi calculado em relação ao peso vivo da ave antes do abate, sendo calculado através da fórmula:

$$RC = \{Peso\ da\ carcaça\ eviscerada\ (g) | Peso\ vivo\ da\ ave\ (g)\} \times 100$$

#### **2.2.4.3 Qualidade da carne**

Foram retiradas amostras da carne do peito sem pele e sem osso, que foram descongeladas a 4° C por 24 h. A capacidade de retenção de água foi determinada utilizando o método de pressão (SIERRA, 1973). Para determinar as perdas por cocção as amostras cruas foram pesadas, envoltas em papel alumínio e grelhadas em grill elétrico (Britânia, Grill Press 180) até que a temperatura interna alcançasse 85°C. As perdas por gotejamento foram determinadas com as amostras condicionadas sob refrigeração (4°C) durante 5 dias em tubos plásticos que permitiam o gotejamento. O pH foi medido utilizando-se um pHmetro digital Marte MB 10 com eletrodo de penetração, com a inserção direta do eletrodo na amostra. A força de cisalhamento foi determinada em texturômetro TA XT Plus. A determinação da cor se deu através da medição em três pontos distintos do peito para obtenção do valor médio em colorímetro Chroma Meter CR-300 (Minolta, Osaka, Japão), usando as leituras de L\*, a\* e b\*, em que: L\* = luminosidade, a\* = componente vermelho-verde e b\*= componente amarelo-azul do sistema de cores CIELAB.

#### **2.2.4.4 Morfometria intestinal**

Amostras de 2 cm do duodeno foram coletadas e fixadas por 24h em solução de formol a 10%, seguidas do processo de desidratação com álcool em concentrações crescentes, até atingir a concentração absoluta. Após as peças passaram pelo procedimento de diafanização e emblocamento em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo com espessura de 5 micrômetros em 12 cortes transversais e semiseriados. A morfometria de altura de vilo e profundidade de cripta

intestinal foram realizadas através de captura da imagem ótica em microscópio Nikon Eclipse E200, com câmera acoplada Motican 5 5.0 MP, com a objetiva 4x, sendo capturadas 10 imagens para cada repetição. A medição foi realizada através do programa Image Pro-Plus 4.5 (IPP4.5) (Media Cybernetics, Silver Spring, USA, 2002), que foi calibrado previamente.

### 2.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA, com Bti e sexo como fatores fixos, sendo as médias comparadas pelo teste de *Tukey*. Para todas as análises realizadas foi utilizado o pacote estatístico R (R CORE TEAM, 2020), com um nível de significância de 5%.

## 2.3 Resultados e discussão

Os resultados das variáveis ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar são apresentados na Tabela 3. Era esperado que a suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti), melhorasse as variáveis de desempenho de frangos de corte. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) para as variáveis analisadas para o fator suplementação. Para o fator sexo observou-se diferenças significativas ( $P<0,05$ ), nos períodos de 1 a 21 dias, 21 a 42 dias e 1 a 42 dias. Frangos de corte machos apresentaram aumento no ganho de peso (701; 1496; 2197 g, respectivamente) e consumo de ração (1038; 2735; 3773 g, respectivamente). Para a variável conversão alimentar, no período de 1 a 21 dias, a melhor conversão alimentar foi atribuída aos machos (1,49;  $P<0,05$ ).

Meurer et al, (2010), ao avaliar o uso *Bacillus subtilis* C-3102 sobre o desempenho de frangos de corte da linhagem Cobb de 1 a 42 dias, observaram aumento no consumo de ração e melhora na conversão alimentar. Sen et al, (2012), avaliando os efeitos da suplementação com *Bacillus subtilis* LS 1-2 sobre o desempenho de frangos de corte da linhagem Ross, observaram aumento no ganho de peso e melhora na conversão alimentar de 1 a 21 dias e de 21 a 35 dias. Liu et al, (2012), utilizando *Bacillus licheniformis* em frangos de corte de 1 a 42 dias, observaram aumento no ganho de peso e melhora na conversão alimentar. Marubashi

et al, (2013) ao avaliar o uso do *Bacillus subtilis* C-3102, sobre o desempenho de frangos de corte Ross 308 machos, observaram melhora de 3,3% no ganho de peso de 1 a 21 dias de idade e 3,0% de melhora na conversão alimentar entre 22 e 42 dias, sendo que no período de 1 a 42 dias as aves suplementadas obtiveram melhor conversão alimentar. Bai et al, (2017), ao suplementarem *Bacillus subtilis* fmbj em frangos de corte Arbor Acres machos, observaram aumento no ganho de peso, consumo de ração e melhora na conversão alimentar de 21 a 42 dias e 1 a 42 dias.

Em nosso estudo o uso da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* não apresentou efeitos sobre o desempenho de frangos de corte, corroborando com os resultados encontrados por Domingues et al, (2014), que ao avaliar o uso da suplementação com *Bacillus subtilis* em frangos de corte machos da linhagem Cobb não encontraram efeito sobre o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar aos 42 dias. A maioria dos probióticos usados em frangos de corte demonstrou ser eficaz com ingestões diárias entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC/g (PATTERSON & BURKHOLDER, 2003, MOUNTZOURIS et al, 2010), portanto a dose usada neste estudo está dentro dos limites recomendados. Como a eficácia do produto depende do número e das características dos microrganismos usados na preparação (TOURNUT, 1998), é difícil traçar paralelos entre os estudos e comparar os resultados. Além disso, as condições higiênicas das instalações e a falta de desafio sanitário durante o experimento, podem ter contribuído para que os resultados ao usar o *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* não fossem positivos. Aves mantidas em áreas desabitadas por longos períodos ou com baixo nível de contaminação ambiental, tendem a apresentar poucos resultados significativos no que diz respeito ao uso de probióticos (KUSSAKAWA & FERREIRA, 1999).

As diferenças entre sexos, superiores para os machos nas variáveis de desempenho, eram esperadas, uma vez que, esses resultados são constantemente observados na avicultura. Stringhini et al, (2003) e Api et al, (2017), também observaram desempenho superior dos machos em relação às fêmeas. Frangos de corte machos, possuem o crescimento mais rápido em função da maior voracidade de consumo de ração, conferindo maior deposição de tecido muscular e ganho de peso (BERTECHINI, 2006).

**Tabela 3.** Ganho de peso (GP), Consumo de ração (CR) e Conversão Alimentar (CA) de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) nos períodos de 1-21 dias, 21-42 dias e 1-42 dias.

| Item                  | GP (g)           |                   |                   | CR (g)            |                   |                   | CA                |            |           |
|-----------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|-----------|
|                       | 1-21 dias        | 21-42 dias        | 1-42 dias         | 1-21 dias         | 21-42 dias        | 1-42 dias         | 1-21 dias         | 21-42 dias | 1-42 dias |
| <b>Efeito do Bti</b>  |                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |            |           |
| Sem Bti               | 658              | 1415              | 2072              | 1016              | 2561              | 3577              | 1,57              | 1,83       | 1,74      |
| Com Bti               | 668              | 1321              | 1989              | 1005              | 2512              | 3517              | 1,52              | 1,97       | 1,80      |
| <b>Efeito do sexo</b> |                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |            |           |
| Macho                 | 701 <sup>b</sup> | 1496 <sup>b</sup> | 2197 <sup>b</sup> | 1038 <sup>b</sup> | 2735 <sup>b</sup> | 3773 <sup>b</sup> | 1,49 <sup>b</sup> | 1,89       | 1,74      |
| Fêmea                 | 625 <sup>a</sup> | 1239 <sup>a</sup> | 1864 <sup>a</sup> | 983 <sup>a</sup>  | 2337 <sup>a</sup> | 3320 <sup>a</sup> | 1,60 <sup>a</sup> | 1,92       | 1,80      |
| SEM                   | 17,1             | 46,9              | 55,7              | 12,3              | 41,7              | 49,4              | 0,03              | 0,07       | 0,04      |
| <b>P-value</b>        |                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |            |           |
| Bti                   | 0,67             | 0,16              | 0,30              | 0,54              | 0,40              | 0,39              | 0,26              | 0,19       | 0,39      |
| Sexo                  | 0,003            | 0,0003            | 0,0001            | 0,003             | <0,0001           | <0,0001           | 0,03              | 0,80       | 0,38      |
| Bti:Sexo              | 0,36             | 0,66              | 0,51              | 0,99              | 0,84              | 0,86              | 0,21              | 0,66       | 0,48      |

<sup>a, b</sup> Letras distintas na coluna indicam diferenças significativas (P <0,05) entre as médias pelo teste de Tukey. SEM: erro padrão da média.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de peso dos órgãos. Não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) do fator suplementação com Bti sob o peso dos órgãos. Dentro do fator sexo, evidenciou-se que machos obtiveram peso do fígado maior em relação às fêmeas (38,2 g vs 33,4 g;  $P<0,05$ ). Manafi et al, (2018), avaliando o uso do probiótico multiespécie contendo quatro espécies de *Bacillus* e *Saccharomyces boulardii* (Microguard®) em frangos de corte machos Ross 308 aos 42 dias, obtiveram peso do fígado e da gordura abdominal menores que o grupo controle, discordando dos resultados deste estudo. Santos et al, (2005) e Schettino et al, (2006), em seus estudos obtiveram peso do fígado maior nas fêmeas, contrastando com nossos resultados. Já Kawauchi et al, (2008) não encontraram diferenças entre sexo para peso do coração, corroborando com os resultados deste estudo. Stringhini et al, (2003) e Api et al, (2017), observaram que fêmeas apresentaram maior rendimento de gordura abdominal, o que não observou-se neste estudo. Fêmeas a partir de 35 dias de idade convertem maior quantidade de gordura na carcaça (BERTECHINI, 2006), ademais, a gordura abdominal é considerada um dos fatores que interferem na conversão alimentar, pois a deposição do tecido adiposo diminui a eficiência alimentar.

**Tabela 4.** Peso dos órgãos de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti).

| Item                  | Moela (g) | Fígado (g)        | Gordura Abdominal (g) | Coração (g) |
|-----------------------|-----------|-------------------|-----------------------|-------------|
| <b>Efeito do Bti</b>  |           |                   |                       |             |
| Sem Bti               | 46,6      | 37,0              | 20,6                  | 10,03       |
| Com Bti               | 43,5      | 34,6              | 18,3                  | 9,96        |
| <b>Efeito do sexo</b> |           |                   |                       |             |
| Macho                 | 47,1      | 38,2 <sup>b</sup> | 17,4                  | 10,98       |
| Fêmea                 | 43,0      | 33,4 <sup>a</sup> | 21,5                  | 9,01        |
| SEM                   | 1,83      | 1,5               | 1,64                  | 0,46        |
| <b>P-value</b>        |           |                   |                       |             |
| Bti                   | 0,23      | 0,27              | 0,32                  | 0,91        |
| Sexo                  | 0,12      | 0,03              | 0,08                  | 0,004       |
| Bti:Sexo              | 0,65      | 0,14              | 0,23                  | 0,58        |

<sup>a, b</sup> Letras distintas na coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias pelo teste de Tukey. SEM: erro padrão da média.

Os resultados de peso vivo, carcaça eviscerada e rendimento de carcaça, estão apresentados na Tabela 5. Não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) do fator suplementação com Bti sob as variáveis peso vivo, carcaça eviscerada e

rendimento de carcaça. Frangos de corte machos obtiveram peso vivo maior em relação às fêmeas (2319 g vs 2088 g;  $P < 0,05$ ), o que era esperado, uma vez que o ganho de peso desses animais foi superior. Mokhtari et al, (2010) estudaram os efeitos da suplementação de *Bacillus subtilis* sob as características de carcaças de frangos, verificaram aumento significativo no rendimento de carcaça quando em comparação com o controle, discordando dos nossos resultados. Já Domingues et al, (2014) usando *Bacillus subtilis* não observaram diferenças significativas para rendimento de carcaça e partes da carcaça de frangos de corte, corroborando com os resultados deste estudo. Além disso, outros estudos usando diferentes dosagens de probióticos relataram variações no desempenho e na resposta da carcaça, sugerindo que as concentrações ideais de probióticos na ração de frangos variam dependendo do microrganismo usado na composição do produto (POURAKBARI et al., 2016).

**Tabela 5.** Peso vivo, carcaça eviscerada e rendimento de carcaça de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti).

| Item                  | Peso vivo (g)     | Carcaça eviscerada (g) | Rendimento de carcaça (%) |
|-----------------------|-------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>Efeito do Bti</b>  |                   |                        |                           |
| Sem Bti               | 2256              | 1634                   | 72,4                      |
| Com Bti               | 2152              | 1567                   | 72,6                      |
| <b>Efeito do sexo</b> |                   |                        |                           |
| Macho                 | 2319 <sup>b</sup> | 1675                   | 72                        |
| Fêmea                 | 2088 <sup>a</sup> | 1525                   | 73                        |
| SEM                   | 77,4              | 58,8                   | 0,36                      |
| <b>P-value</b>        |                   |                        |                           |
| Bti                   | 0,35              | 0,42                   | 0,76                      |
| Sexo                  | 0,04              | 0,08                   | 0,06                      |
| Bti:Sexo              | 0,24              | 0,22                   | 0,35                      |

<sup>a, b</sup> Letras distintas na coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias pelo teste de Tukey. SEM: erro padrão da média.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de peso dos cortes. Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) do fator suplementação com Bti sob o peso da coxa, sobrecoxa, coxinha da asa, ponta da asa, dorso e peito. Frangos de corte machos obtiveram peso da coxa e sobrecoxa superior em relação às fêmeas (116,6 g vs 99,3 g; 132 g vs 108 g, respectivamente,  $P < 0,05$ ), o que era esperado em função do maior ganho de peso e peso vivo atribuído aos machos. Em seu estudo Manafi et al, (2018), ao suplementarem frangos de corte machos da Linhagem Roos 308, com probiótico multiespécie contendo quatro espécies de *Bacillus* e

*Saccharomyces boulardii* (Microguard®), observaram que aos 42 dias a suplementação proporcionou menor peso do peito e não influenciou o peso da coxa, sendo essas reduções comumente devidas à melhor utilização de proteínas e carboidratos. Domingues et al, (2014) ao avaliar o uso da suplementação com *Bacillus subtilis* em frangos de corte machos da linhagem Cobb, aos 42 dias, não encontraram diferenças significativas para o rendimento de coxa, sobrecoxa, asa e peito. Resultados estes que corroboram com os resultados deste estudo. Em contrapartida, Pelicano et al, (2003) observaram maior rendimento de coxas em frangos de corte machos da linhagem Cobb, recebendo probióticos a base de *Bacillus*, *Saccharomyces* e *Lactobacillus*, aos 45 dias.

**Tabela 6.** Peso dos cortes (g) de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti).

| Item                  | Coxa               | Sobrecoxa        | Coxinha da asa | Ponta da asa | Dorso | Peito |
|-----------------------|--------------------|------------------|----------------|--------------|-------|-------|
| <b>Efeito do Bti</b>  |                    |                  |                |              |       |       |
| Sem Bti               | 112                | 125              | 49.7           | 38.6         | 392   | 539   |
| Com Bti               | 104                | 115              | 47.6           | 36.8         | 413   | 522   |
| <b>Efeito do sexo</b> |                    |                  |                |              |       |       |
| Macho                 | 116,6 <sup>b</sup> | 132 <sup>b</sup> | 49.2           | 39.3         | 434   | 558   |
| Fêmea                 | 99,3 <sup>a</sup>  | 108 <sup>a</sup> | 48.1           | 36.1         | 371   | 503   |
| SEM                   | 4,13               | 4,85             | 1,9            | 1,35         | 25,3  | 23,7  |
| <b>P-value</b>        |                    |                  |                |              |       |       |
| Bti                   | 0,23               | 0,15             | 0,43           | 0,35         | 0,57  | 0,62  |
| Sexo                  | 0,004              | 0,0008           | 0,66           | 0,10         | 0,08  | 0,10  |
| Bti:Sexo              | 0,25               | 0,05             | 0,19           | 0,79         | 0,54  | 0,57  |

<sup>a, b</sup> Letras distintas na coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias pelo teste de Tukey. SEM: erro padrão da média.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de pH, capacidade de retenção de água, perda por cocção, perda por gotejamento e força de cisalhamento, onde não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para o fator suplementação com Bti. Frangos de corte machos obtiveram percentagem de perda por cocção superior em relação às fêmeas (29,4% vs 26,8%,  $P < 0,05$ ). Observou-se interação significativa entre Bti:Sexo para a variável perda por cocção ( $P < 0,05$ ), onde machos que não receberam a suplementação obtiveram maior percentagem de perda (31,2%), já as fêmeas não suplementadas apresentaram a menor percentagem de perda (25,9%), machos e fêmeas que receberam a suplementação apresentaram 27,7 e 27,6% de perda, respectivamente, indicando que o uso da suplementação não interfere na perda por cocção levando em consideração o sexo.

Dalólio et al, (2015) ao suplementarem frangos de corte Cobb, por 42 dias, com *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*, não observaram efeitos da suplementação sobre as características de qualidade da carne. Resultados semelhantes foram encontrados por Bai et al, (2017) ao suplementarem *Bacillus subtilis* fmbj em frangos de corte Arbor Acres machos por 42 dias. Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo, onde, o uso da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* não afetou as características de qualidade da carne.

Quando se trata de medir a qualidade da carne, a capacidade de retenção de água e a perda por gotejamento são fatores importantes, pois alguns nutrientes podem ser perdidos no exsudado devido a desidratação, o que pode se refletir na suculência, maciez e sabor da carne (CHEN et al, 2012). Além disso, a capacidade de retenção de água, está correlacionada com as perdas durante o cozimento, pois quanto maior a retenção de líquido na carne, menores são as perdas quando passar por aquecimento. Outro fator importante é a textura da carne, que é determinada pela força de cisalhamento (ALVES et al, 2016). Zhou et al, (2010), relataram em seu estudo que a alimentação com *Bacillus coagulans* ZjU0616 teve efeito positivo na força de cisalhamento, o que não foi observado neste estudo. O pH médio da carne de peito obtido pelos diferentes tratamentos neste experimento está dentro do intervalo de 5,70 a 5,96, considerado como normal para carne de frangos (VAN LAACK et al., 2000).

**Tabela 7.** pH, capacidade de retenção de água (CRA), perda por cocção (PC), perda por gotejamento (PG) e força de cisalhamento (FC) da carne de frangos machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti).

| Item                  | pH   | CRA (%) | PC (%)            | PG (%) | FC (%) |
|-----------------------|------|---------|-------------------|--------|--------|
| <b>Efeito do Bti</b>  |      |         |                   |        |        |
| Sem Bti               | 5,87 | 30,9    | 28,6              | 10,20  | 3,58   |
| Com Bti               | 5,86 | 26,9    | 27,6              | 9,52   | 2,89   |
| <b>Efeito do sexo</b> |      |         |                   |        |        |
| Macho                 | 5,89 | 30,6    | 29,4 <sup>a</sup> | 10,45  | 3,34   |
| Fêmea                 | 5,84 | 27,1    | 26,8 <sup>b</sup> | 9,27   | 3,13   |
| SEM                   | 0,02 | 1,77    | 0,78              | 0,96   | 0,37   |
| <b>P-value</b>        |      |         |                   |        |        |
| Bti                   | 0,89 | 0,11    | 0,39              | 0,62   | 0,20   |
| Sexo                  | 0,21 | 0,17    | 0,02              | 0,40   | 0,69   |
| Bti:Sexo              | 0,06 | 0,10    | 0,02              | 0,43   | 0,43   |

<sup>a, b</sup> Letras distintas na coluna indicam diferenças significativas (P <0,05) entre as médias pelo teste de Tukey. SEM: erro padrão da média.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados para cor da carne, onde não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) para o fator suplementação com Bti e fator sexo. Observou-se interação significativa entre Bti:Sexo para b\*pele ( $P<0,05$ ), onde machos suplementados com Bti obtiveram menor b\*pele (20,3), já os machos não suplementados e as fêmeas suplementadas apresentaram maior b\*pele (24,4 e 24,0, respectivamente), evidenciando que o uso do Bti influenciou o valor de b\*pele em função do sexo.

Bai et al, (2017), avaliaram a cor da carne do peito, ao suplementarem frangos de corte machos da linhagem Arbor Acres com *Bacillus subtilis* fmbJ por 42 dias, observando que a suplementação melhorou significativamente os valores de L\*, a\* e b \*carne, discordando dos resultados encontrados neste estudo. A cor da carne é a primeira característica percebida na hora da compra, principalmente quando se trata de produtos desossados, e também é utilizada como indicador de qualidade, entendida como sinônimo de um produto fresco (MUCHENJE et al, 2009). Além disso, a cor é influenciada principalmente pelo pigmento de mioglobina, cuja concentração depende de fatores como a espécie, a idade do animal, a posição anatômica dos músculos, a dieta, as condições antes do abate e estado de oxidação e oxigenação dos músculos (LIMA JUNIOR et al, 2011).

**Tabela 8.** Cor da carne de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti).

| Item                  | L*pele | a*pele | b*pele | L*carne | a*carne | b*carne |
|-----------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| <b>Efeito do Bti</b>  |        |        |        |         |         |         |
| Sem Bti               | 67,9   | 1,35   | 23,3   | 56,9    | -0,001  | 12,4    |
| Com Bti               | 67,6   | -0,26  | 22,2   | 56,0    | -0,141  | 12,4    |
| <b>Efeito do sexo</b> |        |        |        |         |         |         |
| Macho                 | 68,2   | 1,20   | 22,4   | 56,3    | -0,217  | 11,9    |
| Fêmea                 | 67,3   | -0,11  | 23,1   | 56,6    | 0,074   | 12,9    |
| SEM                   | 0,55   | 0,90   | 0,83   | 0,87    | 0,41    | 0,56    |
| <b>P-value</b>        |        |        |        |         |         |         |
| Bti                   | 0,73   | 0,23   | 0,39   | 0,45    | 0,81    | 0,98    |
| Sexo                  | 0,29   | 0,32   | 0,53   | 0,82    | 0,62    | 0,20    |
| Bti:Sexo              | 0,26   | 0,64   | 0,01   | 0,75    | 0,39    | 0,23    |

SEM: erro padrão da média.

Na tabela 9 estão apresentados os resultados da análise histológica do duodeno. Não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) para a variável comprimento das vilosidades para o fator suplementação com Bti e fator sexo. A suplementação com Bti reduziu a profundidade de cripta (684  $\mu$ m;  $P<0,05$ ). Dong et

al, (2020), suplementando frangos de corte da linhagem Ross 308 com *Bacillus subtilis* BYS2, observaram aos 42 dias que a altura das vilosidades e relação vilosidade:cripta do duodeno eram maiores. Eles sugeriram que esses resultados se deviam à profundidade da cripta mais rasa, resultando em vilosidades mais longas, maior área de superfície das vilosidades e células epiteliais mais absorventes. A cripta é o local de proliferação e diferenciação de enterócitos que migram e aumentam o crescimento das vilosidades (UNI & PERI, 2006), além de criptas mais rasas promoverem um rápido *turnover* celular em resposta à inflamação de bactérias patogênicas (AL-FATAFTAH & ABDELQADER, 2014). Já Souza et al, (2018) avaliaram a suplementação com probióticos a base de *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* em frangos de corte machos da linhagem Cobb. Observaram que aos 42 dias a suplementação não causou efeito na altura das vilosidades e na relação vilosidade: cripta, porém proporcionou menor profundidade de cripta no duodeno, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

**Tabela 9.** Análise histológica do duodeno de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti).

| Item                  | Comprimento vilosidade (µm) | Profundidade de Cripta (µm) |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Efeito do Bti</b>  |                             |                             |
| Sem Bti               | 3423                        | 762 <sup>b</sup>            |
| Com Bti               | 3339                        | 684 <sup>a</sup>            |
| <b>Efeito do sexo</b> |                             |                             |
| Macho                 | 3335                        | 729                         |
| Fêmea                 | 3427                        | 717                         |
| SEM                   | 103                         | 25,2                        |
| <b>P-value</b>        |                             |                             |
| Bti                   | 0,58                        | 0,04                        |
| Sexo                  | 0,53                        | 0,71                        |
| Bti:Sexo              | 0,80                        | 0,14                        |

<sup>a, b</sup> Letras distintas na coluna indicam diferenças significativas (P <0,05) entre as médias pelo teste de Tukey. SEM: erro padrão da média.

Melhor absorção de nutrientes e perdas reduzidas devido ao *turnover* celular estão associadas a uma maior altura das vilosidades e menor profundidade de criptas, resultando em maior relação Vilo:Cripta, podendo ser utilizado como um parâmetro de saúde intestinal (ARRUDA et al, 2008). Além disso, Manafi et al, (2018) relataram que os resultados da suplementação de probióticos, aumento da altura das vilosidades e relação vilosidade/profundidade da cripta, foram resonsáveis pelo ganho de peso e

eficiência através do aumento da digestão e absorção de alimentos.

O *turnover* celular constante, ou seja, a manutenção do tamanho dos vilos e por consequência da capacidade de digestão e absorção intestinal é determinado por dois processos: renovação celular (proliferação e diferenciação), que ocorre mediante mitose sofrida por células totipotentes localizadas na cripta e ao longos dos vilos (UNI et al, 2000) e perda de células (extrusão) que ocorre no ápice dos vilos. Quando ocorre um desequilíbrio do *turnover*, ocorre alteração na altura e perímetro dos vilos (PLUSKE et al, 1997). Segundo Ribeiro (1996), os probióticos competem com os microrganismos patogênicos pelos sítios de adesão na mucosa intestinal, diminuindo a incidência de diarreias, melhorando a absorção dos nutrientes disponíveis, interferindo diretamente no restabelecimento da mucosa intestinal, aumentando a altura das vilosidades.

Em nosso estudo, a relação vilo:cripta para o grupo que recebeu a suplementação com o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* foi maior (4,88) quando comparada ao grupo não suplementado (4,49), indicando que o Bti auxiliou na preservação da integridade intestinal ao exigir menos da cripta, podendo ser um indicativo do potencial probiótico. Pode-se observar que o uso de probióticos na dieta de frangos de corte vem sendo crescente ao longo dos últimos anos, demonstrando efeitos positivos e negativos. Muitas dessas divergências nos resultados encontrados foram devido às cepas de probióticos, administração, dosagem, métodos de preparação, idade da ave, dieta composição e estado de higiene (LEE et al., 2010; ZHANG et al., 2012). Além disso, no que se refere ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* são necessários mais estudos para demonstrar seus efeitos probióticos na nutrição de frangos de corte.

## 2.4 Conclusões

A suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não melhorou as variáveis de desempenho, peso dos órgãos, rendimento de carcaça, peso dos cortes e a qualidade da carne. Na morfometria intestinal a suplementação foi positiva, reduzindo a profundidade de cripta do duodeno.

Frangos de corte machos obtiveram maior ganho de peso e consumo de ração nos períodos avaliados e melhor conversão alimentar de 1 a 21 dias. Apresentaram

maior peso vivo, maior peso do fígado, maiores pesos de coxa e sobrecoxa, maior perda por cocção.

A suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não influenciou as perdas por cocção levando em consideração o sexo.

### Capítulo 3

---

Parâmetros hematológicos e morfometria dos túbulos semíniferos  
de frangos de corte suplementados com *Bacillus thuringiensis*  
var. *israelensis*

### 3.1 Introdução

Desde 1950, antibióticos e quimioterápicos enriquecem a ração animal, levantando preocupações sobre o aparecimento de cepas bacterianas resistentes (SANTANA et al, 2011), motivando estudos sobre aditivos que mantêm a saúde animal sem afetar o seu desempenho. Nesse contexto, a utilização de bactérias benéficas como os probióticos, entre outros aditivos, tem sido utilizada.

Probióticos são microrganismos vivos favoráveis e aproveitados pelo organismo de humanos e animais. Sendo introduzidos como aditivos na ração e contribuindo para melhorar o estabelecimento e manutenção de populações microbianas no trato gastrointestinal dos animais, competindo com microrganismos patogênicos, por espaço e nutrientes (LIMA et al, 2003). Regulam a microbiota do intestino, melhoram o metabolismo dos lipídios, aumentam a imunidade, trazendo benefícios ao hospedeiro (ZHOU et al, 2016).

Esporos de *Bacillus* sp. são amplamente utilizados como probióticos e agentes de exclusão competitiva em humanos e animais, o que os diferencia de outras espécies de microrganismos utilizadas que se encontram em sua forma vegetativa (WULFF, 2015). Pesquisas evidenciam os benefícios de bactérias do gênero *Bacillus* como imunoestimulantes, melhorando o desempenho e a digestibilidade de nutrientes. Também são utilizados na prevenção de problemas intestinais, tendo uma variedade de espécies e aplicações (COELHO, 2013). Estudos com a utilização de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como probiótico na produção de frangos de corte são praticamente inexistentes. A contrário disso, por ser entomopatogênico, destaca-se como a principal bactéria utilizada no controle biológico (ANGELO et al, 2010).

A avaliação do hemograma aviário é importante, porque as células sanguíneas são mensuradas (SOARES et al, 2020), sendo os eritrócitos, trombócitos e leucócitos, os principais. Os leucócitos são divididos em granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos), e agranulócitos (linfócitos e monócitos) (CAMPBELL & DEIN 1984; CAPITELLI & CROSTA, 2013). As alterações fisiológicas podem ser verificadas através da contagem de células sanguíneas de defesa, sendo a relação heterófilo:linfócito (H:L) utilizada para determinar estresse prolongado em frangos de corte (GROSS & SIEGEL, 1983), além de avaliar a imunidade (AL-MURRANI et al., 1997; PATTERSON & SIEGEL, 1998). No entanto, a interpretação do hemograma em

aves é dificultada pela grande variabilidade dos valores de referência. Que podem sofrer alterações conforme a espécie, genética, habitat, sexo, idade, condição fisiológica, estação do ano e outros. Pode ser influenciada pelo procedimento de amostragem, pelo laboratório que trata da amostra e pela técnica utilizada (FOURIE & HATTINGH, 1980; SAMOUR et al., 2011).

Ao contrário dos mamíferos, os testículos das aves estão posicionados na cavidade celomática e não podem ser avaliados diretamente pelo exame andrológico (LEÃO, 2016). A coleta durante o abate, portanto, tornará possível abordar dados reprodutivos valiosos, como no caso do peso testicular, pois este está positivamente associado à produção diária de espermatozoides e à fertilidade. E a morfologia dos túbulos seminíferos está positivamente correlacionada com a produção e qualidade do espermatozoide, o que pode refletir a fertilidade na presença de alterações morfológicas (patologias) (HOCKING, 1990; KIRBY et al., 1998).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, sobre parâmetros hematológicos e morfometria dos túbulos seminíferos testiculares de frangos de corte.

### **3.2 Materiais e métodos**

O experimento foi conduzido no biotério do Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Prof. Dr. Renato Rodrigues Peixoto – UFPEL, conforme aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) UFPEL, sob o protocolo número 9053.

#### **3.2.1 Animais e tratamentos**

Um total de 288 pintos de corte de um dia (machos e fêmeas) da linhagem comercial Cobb foram alojados separados por sexo em boxes de 1 m<sup>2</sup>, com cama de casca de arroz de 10 cm de altura, equipados com comedouros tubulares e bebedouros tipo *nipple*, aquecimento elétrico através de campânulas. O acesso à alimentação e água foi *ad libitum* por 42 dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos com 12 repetições de 6 aves cada (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição dos tratamentos experimentais.

| Tratamento | Suplementação                                         | Sexo  |
|------------|-------------------------------------------------------|-------|
| 1          | Sem suplementação                                     | Macho |
| 2          | Sem suplementação                                     | Fêmea |
| 3          | <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> | Macho |
| 4          | <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> | Fêmea |

### 3.2.2 Programa alimentar

Foi utilizado um programa alimentar de três fases, sendo: inicial (1 até 20 dias), crescimento (21 até 35 dias) e final (36 até 42 dias). As dietas foram formuladas com base nos requerimentos da linhagem, e fornecidas fareladas, tendo a composição e o perfil nutricional descritos na Tabela 2. Não foram adicionadas as dietas nenhum antibiótico ou anticoccidiano durante o período experimental.

### 3.2.3 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

O *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti) utilizado neste estudo faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Para a produção, Bti foi semeado em meio BHI ágar (*Brain Heart Infusion*, Difco) e incubado por 24 horas à 28 °C. Após crescimento, colônias isoladas foram inoculadas em 200 mL de meio BHI e incubados em agitador orbital a 200 rpm durante 24 horas. Os cultivos foram inoculados em 4L de meio NYSM (*Nutrient Yeast Extract Salt Medium*) a 28 °C sob agitação (250 rpm) e aeração (1vvm), por 72 horas. As células foram recuperadas por centrifugação a 6000 × g por 20 min e concentrados em um volume final de 1 L de solução salina fosfatada (PBS). O Bti foi suplementado na quantidade de 1 x10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g de ração diariamente, durante 42 dias.

**Tabela 2.** Composição centesimal e perfil nutricional das dietas experimentais.

| Ingrediente (kg)                   | Dieta inicial*<br>(1-20 dias) | Dieta<br>crescimento**<br>(21-35 dias) | Dieta<br>terminação**<br>(36-42 dias) |
|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| Milho                              | 57.07                         | 61.05                                  | 64.41                                 |
| Farelo de soja                     | 38.03                         | 33.51                                  | 30.6                                  |
| Óleo                               | 2.5                           | 3.2                                    | 3.0                                   |
| Carbonato de cálcio                | 1.40                          | 1.33                                   | 1.20                                  |
| Sal                                | 0.43                          | 0.42                                   | 0.39                                  |
| L-Lisina                           | 0.164                         | 0.169                                  | 0.148                                 |
| DL-Metionina                       | 0.322                         | 0.256                                  | 0.192                                 |
| L-Treonina                         | 0.085                         | 0.065                                  | 0.060                                 |
| Total                              | 100.0                         | 100.0                                  | 100.0                                 |
| <b>Composição calculada</b>        |                               |                                        |                                       |
| Energia Metabolizável<br>(Kcal/Kg) | 2980                          | 3070                                   | 3100                                  |
| Proteína Bruta (%)                 | 20.8                          | 19.0                                   | 18.0                                  |
| Cálcio (%)                         | 0.95                          | 0.96                                   | 0.90                                  |
| Sódio (%)                          | 0.20                          | 0.19                                   | 0.18                                  |
| Fósforo disponível (%)             | 0.46                          | 0.41                                   | 0.41                                  |
| Met + Cys dig (%)                  | 0.95                          | 0.90                                   | 0.86                                  |
| Lisina dig (%)                     | 1.20                          | 1.05                                   | 0.98                                  |
| Treonina dig(%)                    | 0.85                          | 1324                                   | 1261                                  |

\*Concentrado: Colina 7.430 mg; Ácido fólico 127,76 mg; Vitamina E 311.72 UI; Vitamina K3 26,28 mg; Vitamina B2 85,41 mg; Vitamina B6 43,80 mg; Ferro 1.800 mg; Zinco 1.667 mg; Vitamina D3 38.180 UI; Vitamina A 172.170 UI; Vitamina B1 26,28 mg; Cobre 300 mg; Iodo 20 mg; Ácido Nicotínico 569,40 mg; Ácido Pantoténico 255,65 mg; Vitamina B12 222,20 mcg; Manganês 2.100 mg; Selênio 10 mg; Cálcio 247 g; Fósforo 110,57 g.

\*\*Concentrado crescimento: Colina (Min) 4.780 mg; Ácido fólico (Min) 58,56 mg; Vitamina E (Min) 365.85 UI; Vitamina K3 (Min) 25,18 mg; Vitamina B2 (Min) 80 mg; Vitamina B6 (Min) 44,36 mg; Ferro (Min) 1.800 mg; Zinco (Min) 1.667 mg; Vitamina D3 (Min) 25.182 UI; Vitamina A (Min) 110.040 UI; Vitamina B1 (Min) 24,27 mg; Cobre (Min) 300 mg; Iodo (Min) 20 mg; Ácido Nicotínico (Min) 482,34 mg; Ácido Pantoténico (Min) 226,35 mg; Vitamina B12 (Min) 203,85 mcg; Manganês (Min) 2.100 mg; Selênio (Min) 10 mg; Cálcio (Min) 221,7 g; Fósforo (Min) 98,70 g.

### 3.2.4 Variáveis analisadas

#### 3.2.4.1 Parâmetros hematológicos

Aos 42 dias foram selecionados e eutanasiados 48 frangos, sendo 12 aves por tratamento com peso corporal representando a média do boxe. Foi coletado 1 mL de sangue a partir de punção na veia ulnar das aves. O esfregaço sanguíneo foi preparado com coloração panótica rápida e avaliado em microscópio óptico, pelo mesmo técnico treinado. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada com a contagem de 200 leucócitos fixos no esfregaço sanguíneo, classificados em: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (HARVEY, 2001).

#### 3.2.4.2 Morfometria dos túbulos semíniferos

Aos 42 dias os testículos dos machos eutanasiados, foram coletados, pesados e pré-fixados em solução de paraformol 4% por 2 horas, seccionados em fatias de 2 mm de espessura, e fixados por mais 12 horas. Após foram colocados em cassetes desidratados, diafanizados e impregnados no processador automático de tecidos (ASP 200, Leica Germany), sendo incluídos em Paraplast Xtra (P3808 - Sigma Aldrich). Posteriormente foram seccionados com 5 µm no microtomo rotativo automatizado (RM2245 Leica Germany), e às lâminas coradas com Hematoxilina e eosina de acordo com Carson & Hladik (2015). As capturas de imagem foram realizadas em microscópio biológico (BX 51 Olympus) com câmera digital resfriada acoplada (DP72 Olympus). As imagens (diâmetro e espessura) dos túbulos seminíferos dos testículos foram mensuradas através do programa ImageJ. Para o cálculo das médias de diâmetro e espessura do epitélio de cada animal, foram confeccionadas duas lâminas, sendo fotografados dez túbulos seminíferos de cada. Em cada túbulo seminífero foi mensurado o diâmetro menor e a espessura epitelial menor encontrados. Para padronização da escala de medida, foi fotografada uma régua micrometrada e feita a conversão de pixels para micras (frações).

### **3.2.5 Análise estatística**

Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA, com Bti e sexo como fatores fixos, sendo as médias comparadas pelo teste de *Tukey*. Para todas as análises realizadas foi utilizado o pacote estatístico R (R CORE TEAM, 2020), com um nível de significância de 5%.

## **3.3 Resultados e discussão**

Os resultados dos parâmetros hematológicos estão apresentados na Tabela 3. Esperava-se que a suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), aumentasse os resultados dos principais tipos celulares encontrados no sangue das aves, o que seria um indicativo da melhora da resposta imune destes animais. No entanto, não foram identificados efeitos significativos ( $P>0,05$ ) dos fatores principais do experimento sobre os componentes do sangue e na relação heterófilos:linfócitos.

Do total de leucócitos sanguíneos, 60 a 65% são linfócitos, 25 a 30% são

heterófilos, 2% são eosinófilos, 1,7% são basófilos e 10% são monócitos. Parâmetros estes que podem variar de acordo com o tipo de espécie, meio ambiente onde vivem, sexo, idade e ação hormonal. Além de sofrer influência dos métodos utilizados para a obtenção do sangue e das análises (CAMPBELL & DEIN, 1984; MELUZZI et al., 1992). Atribui-se aos probióticos um efeito benéfico na redução dos níveis de estresse em frangos de corte aumentando os linfócitos e contribuindo desta forma no aumento da resistência a infecções (PARYAD & MAHMOUDI, 2008). No entanto, os valores de linfócitos no presente estudo não foram significativamente afetados pela suplementação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

**Tabela 3.** Valores hematológicos de frangos de corte machos e fêmeas suplementados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti).

| Item                  | Heterófilos | Eosinófilos | Linfócitos | Monócitos | H:L  |
|-----------------------|-------------|-------------|------------|-----------|------|
| <b>Efeito do Bti</b>  |             |             |            |           |      |
| Sem Bti               | 92,7        | 29,6        | 76,4       | 1,92      | 1.29 |
| Com Bti               | 85,1        | 31,2        | 82,4       | 1,81      | 1.10 |
| <b>Efeito do sexo</b> |             |             |            |           |      |
| Macho                 | 89,4        | 29,1        | 80,1       | 2,10      | 1.19 |
| Fêmea                 | 88,4        | 31,7        | 78,7       | 1,62      | 1.20 |
| SEM                   | 2,66        | 2,6         | 3,4        | 0,28      | 0.08 |
| <b>P-value</b>        |             |             |            |           |      |
| Bti                   | 0,05        | 0,67        | 0,23       | 0,90      | 0.10 |
| Sexo                  | 0,76        | 0,45        | 0,76       | 0,22      | 0.93 |
| Bti:Sexo              | 0,11        | 0,04        | 0,71       | 0,34      | 0.63 |

H:L - relação heterófilos:linfócitos; SEM: erro padrão da média.

As alterações fisiológicas podem ser verificadas através da contagem de células sanguíneas de defesa, sendo a relação heterófilo:linfócito (H:L) utilizada para determinar estresse prolongado em frangos de corte (GROSS & SIEGEL, 1983), pode ser a variável mais confiável para avaliar o bem-estar de aves em relação as concentrações plasmáticas de corticosterona (FURLAN & MACARI, 2002; NICOL et al., 2009, PRIETO & CAMPO, 2010), além de estimar a imunidade (AL-MURRANI et al., 1997; PATTERSON & SIEGEL, 1998). Os resultados encontrados neste estudo pra relação H:L, estão fora dos valores considerados normais de 0,5 por Macari & Luqueti (2002), porém, estão de acordo com os resultados de Laganá & Ribeiro (2007), que encontraram relações H:L superiores a 0,62 em frangos durante o transporte por mais de 3 horas e em altas temperaturas.

Mudanças significativas no número de leucócitos aviários ocorrem em resposta

a processos infecciosos, portanto, sua interpretação possibilita avaliar a resposta imune do animal (SCHMIDT et al., 2007). Visto que a hematologia é fundamental para a detecção precoce da doença, destaca-se a importância de estudos que caracterizem e estabeleçam valores de referência para os parâmetros hematológicos, a fim de fornecer orientações informadas. Atento às variações decorrentes de fatores fisiológicos, como o sexo, nutrição, idade, auxiliando na identificação de alterações patológicas e diagnósticos precoces e mais precisos.

Os resultados da morfometria dos túbulos seminíferos estão apresentados na Tabela 4. Não foram identificados efeitos significativos ( $P>0,05$ ) da suplementação com o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre o peso dos testículos, diâmetro do túbulo seminífero e espessura do epitélio seminífero. Os primeiros sinais de atividade espermatogênica manifestam-se a partir da 10ª hora de incubação, pela diferenciação das células germinativas. O desenvolvimento testicular e o estabelecimento da espermatogênese ocorrem em duas fases (pré-púbere e púbere). No período pré-púbere ocorre uma proliferação intensa de células de Sertoli, sendo que, seu número total por testículo aumenta de 1 a 5 milhões do primeiro dia de idade, para 100 milhões ou mais até as 10 semanas, número que dificilmente irá variar na idade adulta, sendo um indicativo que a produção de espermatozoides é determinada em uma idade precoce (SAUVEUR & REVIERS, 1988).

**Tabela 4.** Morfometria (diâmetro e espessura epitelial) dos túbulos seminíferos dos testículos de frangos de corte suplementados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti).

| Item           | Peso (g) | Diâmetro (µm) | Espessura(µm) |
|----------------|----------|---------------|---------------|
| Sem Bti        | 0,75     | 184           | 53,8          |
| Com Bti        | 0,59     | 162           | 54,4          |
| SEM            | 0,11     | 15,6          | 3,6           |
| <b>P-value</b> | 0,33     | 0,30          | 0,91          |

SEM: erro padrão da média.

No nascimento o peso testicular médio de um pintinho de um dia é de 3 a 5 mg, sendo os túbulos seminíferos correspondentes a 60% do volume testicular total. O desenvolvimento dos túbulos seminíferos se dá em função da proliferação das células de Sertoli, sendo que até as 7 semanas, o peso testicular aumenta de 3 a 100 mg, o diâmetro do túbulo seminífero duplica, passando de 30 a 60 µm, sendo quádruplo ou quádruplo depois, e a proporção aumenta de 60 para 90% (SAUVEUR & REVIERS, 1988).

Na ave adulta, Colenbrander & Kemp (1990), Etches (1996) e Morris et al, (1999) afirmaram que o peso testicular e a quantidade de espermatozóides produzidos estão correlacionados. Oyeyemi & Okediran (2007), Oyeyemi et al, (2002), mostraram através de seus estudos que os testículos que são maiores em tamanho tendem a possuir maior produção de espermatozoides do que os menores. Nossos resultados indicam que não houve efeito da suplementação com *Bacillus thuringiensis* sobre o peso de testículo e diâmetro de túbulos seminíferos, o que pode ser um indicativo de que a suplementação não influencia a taxa de fertilidade de frangos de corte machos, uma vez que para Berndtson et al, (1987), relataram que testículos com mais células de Sertoli são maiores em tamanho e tendem a produzir mais espermatozóides do que aqueles com menos células de Sertoli.

Segundo Ewuola (2013), dois fatores importantes na seleção dos machos reprodutores são o número de espermátócitos de boa qualidade e a capacidade dos testículos em armazenar com eficiência os espermatozóides produzidos. Portanto, a capacidade de um animal macho de armazenar esperma nos testículos determina sua fertilidade. A medição tubular é geralmente o método tradicional utilizado para avaliar a espermatogênese em qualquer investigação da função testicular (SILVA et al, 2006), mostrando a importância de estudos que avaliem essas características.

### **3.4 Conclusões**

A suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não afetou os parâmetros hematológicos e a morfometria dos túbulos seminíferos dos testículos de frangos de corte.

#### 4 Considerações Finais

A suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não melhorou as variáveis de desempenho, peso dos órgãos, rendimento de carcaça, peso dos cortes e a qualidade da carne. Na morfometria intestinal a suplementação foi positiva, reduzindo a profundidade de cripta do duodeno. Frangos de corte machos obtiveram maior ganho de peso e consumo de ração nos períodos avaliados e melhor conversão alimentar de 1 a 21 dias. Apresentaram maior peso vivo, maior peso do fígado, maiores pesos de coxa e sobrecoxa, maior perda por cocção.

A suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não influenciou as perdas por cocção levando em consideração o sexo. Porém reduziu o b\*pele dos machos suplementados e aumentou nas fêmeas.

A suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não produziu efeitos significativos sobre os parâmetros hematológicos e a morfometria dos túbulos seminíferos dos testículos de frangos de corte.

Levando em consideração as observações deste trabalho, são necessários mais estudos para esclarecer quais efeitos o uso do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pode produzir em frangos de corte.

## Referências

- ABEDINI, M.; SHARIATMADARI, F.; TORSHIZI, M.K.; AHMADI, H. Effects of a dietary supplementation with zinc oxide nanoparticles, compared to zinc oxide and zinc methionine, on performance, egg quality, and zinc status of laying hens. **Livestock Science**, v.203, p.30-36, 2017.
- AL-FATAFTAH, A-R.; ABDELQADER, A. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. **Animal Feed Science and Technology**. v.198, p.279-285, 2014.
- AL-MURRANI, W.K.; KASSAB, A.; AL-SAM, H.Z. et al. Heterophil/lymphocyte ratio as a select ion criterion for heat resistance in domestic fowls. **British Poultry Science**, v.38, p.159-163, 1997.
- ALVES, M.G.N.; ALBUQUERQUE, L.F; BATISTA, A.S.M. Qualidade da carne de frangos de corte. **Essentia**, v. 17, n. 2, p. 64-86, 2016.
- AMERAH, A. M.; QUILLES, A.; MEDEL, P.; S´ANCHEZ, J.; LEHTINEN, M. J.; GRACIA, M. I. Effect of pelleting temperature and probiotic supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.180, p.55–63, 2013.
- ANDREATTI FILHO, R.L; SILVA, E.N. Probióticos e correlatos na produção avícola. In: PALERMO NETO, T. SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo. Roca, Cap.15, p.225-248, 2005.
- ANGELO, E.A.; VILAS-BOAS, G.T.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.4, p.945-958, 2010.
- API, I.; TAKAHASHI, S.E.; MENDES, A.S.; PAIXÃO, S.J.; REFATI, R.; RESTELATTO, R. Efeito da sexagem e linhagens sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Ciência animal brasileira**. v.18, p.1-10, 2017.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILASBÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária, p.269-293, 2002.
- ARRUDA, M. V. A.; FERNANDES, R. T. V.; SILVA, J. M. et al. Avaliação morfo histológica da mucosa intestinal de coelhos alimentados com diferentes níveis e fontes de fibra. **Revista Caatinga**, v.21, p.01-11, 2008.
- BAI, K.; HUANG, Q.; ZHANG, J.; HE, J.; ZHANG, L.; WANG, T. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, n.1, p.74-82, 2017.
- BEAUMONT, M. Flavouring composition prepared by fermentation with *Bacillus* sp.

**International Journal of Food Microbiology**, v,75, p.189-196, 2002.

BERNDSTON, W.E; IGBOELI, G.; PICKETT, B.W. Relations hip between absolute number of sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in Young beef bulls. **Journal of Animal Science**, v.64, p. 241-246, 1987.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de Monogástricos**. Lavras: Editora UFLA, 301p, 2006.

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 AVÍCOLA, **Anais...**Santos: APINCO, 1993.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v.41, n.2, p. 323-342, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 44, de 15 de dezembro de 2015**. Altera a Instrução Normativa SARC nº 13 de 2004 e Instruções Normativas MAPA nºs 15 e 30 de 2009 e 29 de 2010. In. Dou, 15 dezembro de 2015.

BRAVO, A.; GILLB, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v.49, n.4, p.423-435, 2007.

CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. **Avian Hematology**. The Basics Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice. v.14, n. 2, p. 223 – 248, 1984.

CANALLI, L.S.; FLEMMING, J.S.; MIRA, R.T.; BRASILE, L.F. Alteração da microbiota intestinal de frangos de corte pela utilização de probiótico na alimentação. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p.125-132,1996.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.16, p. 71-120, 2013.

CARSON, F; HLADIH, C. **Histotechnology: A Self-Instructional Text**. American Society for Clinical Pathology; 3rd Edition. 400p, 2015.

CARTMAN, S.T., LA RAGIONE, R.M., WOODWARD, M.J. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, v.74, n.16, p. 5254-5258, 2008.

CHEN, H.; DONG, X.; YAO, Z.; XU, B.; ZHEN, S.; LI, C.; LI, X. Effects of prechilling parameters on water-holding capacity of chilled pork and optimization of prechilling parameters using response surface methodology. **Journal of Animal Science**, v.90, p.2836-2841, 2012.

CHEN, K.L., KHO, W.L., YOU, S.H., YEH, R.H., TANG, S. W. & HSIEH, C. W. Effects

of *Bacillus subtilis* var. *natto* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. **Poultry Science**, v. 88, n.2, p.309-315, 2009.

COELHO, J.G. **Potencial probióticos de bactéria do gênero *Bacillus***. 58f. Trabalho de conclusão de curso – Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

COLENBRANDER, B.; KEMP, B. Factors influencing semen quality in pigs. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.40, p.105-115, 1990.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs. 2003. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R0355&from=EN>. Acesso em 20 de março de 2021.

CRAWFORD, J.S. Probiotics in animal nutrition. In: **ARKANSAS NUTRITION CONFERENCE**, 1979, Arkansas. Proceedings... Arkansas: [s.n.], p. 45-55, 1979.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. 2008. Disponível: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)>. Acesso em: 24 de abril. 2021.

CUEVAS, A.C.; GONZALEZ, E.A.; HUGUENIN, M.C; DIMÍNGUEZ, S.C.. El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. **Veterinária México**, v.31, n 4, 2000.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214-220, 2011.

DALÓLIO, F.S; MOREIRA, J.; VALADARES, L.R.; NUNES, P.B.; VAZ, D.P.; PEREIRA, J.H.; PIRES, A.V.; DA CRUZ, P.J.R. Aditivos alternativos ao uso de antimicrobianos na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.5, n.1; p.86-94, 2015.

DIAS, J.M.C.S. Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.59-76, 1992.

DOMINGUES, C. H., SANTOS, E. T., CASTIBLANCO, D. C., QUADROS, T. C. O., PETROLI, T. G., DUARTE, K. F., & JUNQUEIRA, O. M. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo probiótico nas diferentes fases de criação. **Revista Agrocientífica**, v.1, n.1, p.7-16, 2014.

DONG, Y.; LI, R.; LIU, Y.; MA, L.; ZHA, J.; QIAO, X.; CHAI, T.; WU, B. Benefit of Dietary Supplementation with *Bacillus subtilis* BYS2 on Growth Performance, Immune Response, and Disease Resistance of Broilers. **Springer Science+Business Media**,

LLC, part of Springer Nature 2020, 2020.

DURKEE, D.L. Coming out of the dairy case: New developments, In: **Shelf stable probiotic foods**, 2010. Disponível em: <http://www.foodmaster.com>. Acesso em 4 de maio de 2021.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotics uses in poultry. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 75 – 97, 2003.

ESTRADA, A; WILKIE D.C; DREW M. Administration of *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.

ETCHES, R. J. **Reproducción Aviaria**. Acribia. Zaragoza. 339p, 1996.

EWUOLA, E. O. Daily sperm production, gonadal and extra-gonadal sperm reserves of rabbits fed prebiotic and probiotic supplemented diets. **International Journal of Applied Agricultural and Apicultural Research**. v. 9, p.48-53, 2013.

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

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

FOURIE, F. R.; HATTINGH, J. Variability in bird hematology. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Comparative physiology**, Oxford, v. 65A, p. 147-150, 1980.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, Atheneu, p.182, 2002.

FRITTS, C.A; KERSEY J. H; MOTL, 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**, v.9, n.2, p.149-155, 2000.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

FULLER, R.; NEWLAND, L.G.M.; BRIGGS, C.A.E.; BRAUDE, R.; MITCHELL, K.G. The normal intestinal flora of the pig. IV. The effect of dietary supplements of penicillin, chlortetracycline or copper sulfate on the cecal flora. **Journal Applied Bacteriology**, v.23, p.195-205, 1960.

FURLAN, R. L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 209-230, 2002.

GHADBAN, G.S. Probiotics in broiler production – a review. **European Poultry Science**. v.66, n.2, p.49-58, 2002.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis biology, ecology and safety*. Chichester: **John Wiley & Sons**, 350 p., 2000.

GOLDBERG, L.J.; MARGALIT, J. A. Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito news**, v.39, p.541-544, 1977.

GORDON R.; HAYNES W.; PANG C. The genus *Bacillus*. In: **US Department of Agriculture handbook**, Washington DC - USDA, n.427, p.109-26, 1973.

GROSS, W.B.; SIEGEL, H.S. Evaluation of the heterophil:lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases**, v.27, n.4, p.972-979, 1983.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **ALVES, S. B. (Coord.). Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, p.130-140, 1986.

HALPHIDE, B. Role of probiotics in animal nutrition and their link to the demands of European consumers, In: **Role of the European Probiotic Association**. Proceedings... Needertlands, p. 3-4, 2003.

HARVEY JW. Examination of blood samples. In: **Atlas of Veterinary Hematology**, Harvey J. W. (ed.). WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, p. 3-20, 2001.

HAVENAAR, R.; HUIS INT VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease. **Elsevier Applied Science**, p.151-170, 1992.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, n.8, p.506-514, 2014.

HOCKING, P. M. The relationships between dietary crude protein, body weight, and fertility in naturally mated broiler breeder males. **Poultry Science**, v.31, p.743-757, 1990.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. O uso de formadores de esporos bacterianos como probióticos. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Abate de bovinos cai e de frangos é recorde no primeiro trimestre**. 2021. Disponível em: <agenciadenoticias.ibge.gov.br>.

JIN, L. Z., HO, Y. W., ABDULLAH, N., ALI, M. A., & JALALUDIN, S. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. **Animal and Feed Science Technology**, v.70, p.197-209, 1998.

JUNQUEIRA, O.M. TANAKA, A.H. DALANEZI, J.A. GARCIA, E. A. DUARTE, K.F.DALANEZI, L.M. Antibiótico, probiótico, prebiótico e simbiótico sobre desempenho de frangos de corte de 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, s.8, p.60, 2006.

KAUR, I.P; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, p.1–9, 2002.

KAWAUCHI, I.M.; SAKOMURA, N.K.; BARBOSA, N.A.A.; AGUILAR, C.A.L.; MARCATO, S.M.; BONATO, M.A.; FERNANDES, J.B.K. Efeito de programas de luz sobre o desempenho e Rendimento de carcaça, cortes comerciais e vísceras comestíveis de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.24, n.1, p.59-65. 2008.

KIRBY, J. D.; WASHINGTON, J.; RHOADS, M. L.; KREIDER, D.L. Impaired testis development and spermatogenesis in adult male fowl following unrestricted prepubertal growth and subsequent growth restriction. **Poultry Science**, v.77 (suppl.1), p.91, 1998.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. **Revue Scientifique Technique de L Office International des Epizooties**, v.8, n.2, p.517-531, 1989.

KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, pág. 1457-1465, 2014.

KUSSAKAWA, K. C. K. e FERREIRA, A. B. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. In: **Manual técnico. Biotecnal**, 1999.

LAGANÁ, C.; RIBEIRO, A.M.L. A influência da temperatura na alimentação de frangos de corte. **Boletim da Indústria Animal**, v.64, n.1, p.79-89, 2007.

LEÃO, R. A. C. **Morfometria testicular, escores de crista, cloaca e de pé em galos de matriz pesada em duas idades e três categorias de peso corporal**. 52f. Dissertação – Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal Minas gerais, Belo Horizonte, 2016.

LEE, K.W.; LI, G.; LILLEHOJ, H.S.; LEE, S-H.; JANG, S.I.; BABU, U.S.; LILLEHOJ, E.P.; NEUMANN, A.P.; SIRAGUSA, G.R. *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials augment macrophage function in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.91, n.3, p.87-91, 2011.

LEE, K., H. S. LILLEHOJ, AND G. R. SIRAGUSA. Direct-Fed Microbials and Their Impact on the Intestinal Microflora and Immune System of Chickens. **Japanese Poultry Science**, v.47, p.106–114, 2010.

LEE, J.; PARK, I.; CHOI, Y.; CHO, J. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro

evaluation of its potential probiotic properties. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, Medellín, v. 25, n. 4, p. 577-585, 2012.

LEEDLE, J. Probiotica and DFMs – mode of action in the gastrointestinal tract. In: Simpósio sobre aditivos alternativos na nutrição animal. **Anais...**Campinas:CBNA, p. 25-40, 2000.

LEMA, M., WILLIAMS, L., RAO, D.R. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. **Small Ruminant. Research**, v.39, n.1, p.31-39, 2001.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 1, p. 747-748, 1965.

LIMA, A.C.F.; PIZAURO JR., J.M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E.B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.1, p.200-207, 2003.

LIMA JUNIOR, D. M.; RANGEL, A. H. N.; URBANO, S. A.; MACIEL, M. V.; AMARO, L. P. A. Alguns aspectos qualitativos da carne bovina: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.4, p.351-358, 2011.

LIU, X.; YAN, H.; LV, L.; XU, Q.; YIN, C.; ZHANG, K.; WANG, P.; HU, J. Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water. **Journal Animal Science**. v.25, n.5, p.682-689, 2012.

LODDI, M.M.; GONZALES, E.; TAKITA, T.S.; MENDES, A.A. Effect of the use of probiotic and antibiotic on the performance, yield and carcass quality of broilers. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.29, n.4, p.1124-1131, 2001.

LODDI, M.M.; GONZALES, E.; TAKITA, T.S.; MENDES, A.A. Adição de probiótico e antibiótico como promotor de crescimento para frangos de corte. Características de carcaça. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLA. **Anais...**Campinas:FACTA, p.31, 1998.

LORA GRAÑA, A. **Uso de probiótico em rações de frango de corte**. Dissertação - Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

MACARI, M.; FURLAN, R.L. Probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, **Anais**, Santos: FACTA, p. 53-68, 2005.

MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2.ed. Jaboticabal: Funep/ Unesp, 2002. p.17-36.

MALDONADO-BLANCO, M. G.; ROMERO, G. S.; GALÁN-WONG, L. J. The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* supbs. *Israelenses* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, n. 7, p.671-674, 2003.

MAIORKA, A. Adaptações digestivas pós eclosão. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, **Anais**, Campinas: FACTA, p.141-152, 2001.

MANAFI, M. Comparison study of a natural non-antibiotic growth promoter and a commercial probiotic on growth performance, immune response and biochemical parameters of broiler chicks. **J. Poultry Science**. v.52, p.274-281, 2015.

MANAFI, M.; HEDAYATI, M.; MIRZAEI, S. Probiotic *Bacillus* species and *Saccharomyces boulardii* improve performance, gut histology and immunity in broiler chickens. **South African Journal of Animal Science**, v. 48, n. 2, 2018.

MANAFI, M.; KHOSRAVINIA, H. Effects of aflatoxin on the performance of broiler breeders and its alleviation by herbal mycotoxin binder. **Journal of Agricultural Science and Technology**. v.15, p.55-63, 2013.

MARUBASHI, T.; GRACIA, M.I.; ESTEVE-GARCIA, E. The efficacy of the probiotic feed additive Calsporin® (*Bacillus subtilis* C-3102) in broilers: combined analysis of four different studies. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v.1, p.1-5, 2013.

MARUTA, K. Probióticos e seus benefícios. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, **Anais...**Santos: APINCO, p.203-219, 1993.

MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrheal microorganism. **Boll Chim Farm**, v.133, p.3-18, 1994.

MELUZZI, A.; PRIMICERI, G.; GIORDANI, R.; FABRIS, G. Determination of blood constituents reference values in broilers. **Poultry Science**, v.71, p. 337 – 345, 1992.

MENTEN, J.F.M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de ave: In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, **Anais...**Uberlândia: Colégio Brasileiro de nutrição animal, p.251-276, 2002.

MEURER, R.F.P.; LEAL, P.C.; DA ROCHA, C.; BUENO, I.J.M.; MAIORKA, A.; DAHLKE, F. Evaluation of the use of probiotics in diets with or without growth promoters for broiler chicks. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2687-2690, 2010.

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 501-522, 2008.

MOHAN, B.; KADIRVEL, R.; NATARAJAN, A.; BHASKARAN, M. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. **British Poultry Science**, v.37, p.395-401, 1996.

MOKHTARI, R.; YAZDANI, A. R.; REZAEI, M.; GHORBANI, B. The effects of different growth promoters on performance and carcass characteristics of broiler chickens. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.20, p.2633-2639, 2010.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA. U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.).

**Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** Porto Alegre: Edgar Blücher, v.3, p. 245-265, 2001.

MORRIS, J.R.; CHEN, J.L.; FILANDRINOS, S.T.; DUN, R.C.; FISK, R.; GEYER, P.K.; WU, C. An analysis of the transvection at the yellow locus *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. v.151, n.12, p.633-651, 1999.

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

MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P. E.; HUGO, A.; RAATS, J. G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. **Food Chemistry**, v.112, p.279-289, 2009.

NEPOMUCENO, E.S.; ANDREATTI, R.L.F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria, RS. **Anais...** Concórdia, SC: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, v.1, p.45-55, 2000.

NICOL, C. J.; CAPLEN, G.; EDGAR, J.; BROWNE, W. J. Associations between Welfare indicator sand environmental choice in laying hens. **Animal Behaviour**, v. 78: 413-424, 2009.

NITHYA, V.; HALAMI, P. M. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. **Annals of Microbiology**, v.63, n.1, p.129–137, 2012.

NOSRATI, M.; JAVANDEL, F.; CAMACHO, L.M.; KHUSRO, A.; CIPRIANO M.; SEIDAVI, A.; SALEM, A.Z.M. The effects of antibiotic, probiotic, organic acid, vitamin C, and Echinacea purpurea extract on performance, carcass characteristics, blood chemistry, microbiota, and immunity of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v.26, p.295-306, 2017.

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

OKUMURA, S.; OHBA, M.; MIZUKI, E.; CRICKMORE, N.; CÔTÉ, J-C.; NAGAMATSU, Y.; KITADA, S.; SAKAI, H.; HARATA, K.; SHIN, T. Parasporin nomenclature. 2010. Disponível em: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>. Acesso em: 24 de abril de 2021.

OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v.9, n.1, p.43-52, 1999.

OYEYEMI, M.O.; OKE, A.; OLUSOLA, C.; AJALA, O.; OLUWATOYIN, O.; IDEHEN, C.O. Differences in testicular parameters and morphological characteristics of spermatozoa as related to age of West African Dwarf bucks. Tropical. **Journal of Animal Science**. v.5, p.99-107, 2002.

OYEYEMI, M.O.; OKEDIRAN, B.S. Testicular parameters and sperm morphology of chinchilla rabbits fed with different planes of soybean meal. **International Journal of Morphology**. v.25, p.139-144, 2007.

PARYAD, A.; MAHMOUDI, M. Effect of different levels of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance, blood constituents and carcass characteristics of broiler chicks African Journal of Agricultural Research. V.3, p.836-842, 2008.

PARKER, R. B. Probiotics. The other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, Londres, v. 29, p. 4-8, 1974.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v.82, n.4, p.627-631, 2003.

PATTERSON, P.H.; SIEGEL, H.S. Impact of cage density on pullet performance and blood parameters of stress. **Poultry Science**, v.77, p.32-40, 1998.

PELICANO, E.R.L., SOUZA, P.A., SOUZA, H.B.A., OBA, A., NORKUS, E.A., KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.5,n.3, p.207-214, 2003.

PETRI, R. Uso de exclusão competitiva na avicultura no brasil. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, **Anais**. Santa Maria-RS, 2000.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v.51, p.215-236, 1997.

POURAKBARI, M.; SEIDAVI, A.; ASADPOUR, L.; MARTÍNEZ, A. Probiotic level effects on growth performance, carcass traits, blood parameters, cecal microbiota, and immune response of broilers. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.88, n.2, p.1011-1021, 2016.

PRIETO, M. T.; CAMPO, J. L. Effect of heat and several additives related to stress level on fluctuating asymmetry, heterophil:lymphocyte ratio, and tonicim mobility duration in White Leghorn chicks. **Poultry Science**, v. 89: 2071-2077, 2010.

R Core Team (2020). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAPOSO, R.S.; DEFENSOR, R.H.; GRAHL, T.R. Uso de probióticos na avicultura para o controle da *Salmonella* spp.: Revisão e perspectivas de utilização. **PUBVET**, Brasília, v.13, n.4, p.1-8, Abril, 2019.

REIS, T.L.; VIEITES, F.M. Antibiótico, Probiótico, Prebiótico e Simbiótico em rações de frangos de corte e galinhas poedeiras. **Ciência Animal**, v. 29, n. 3, p. 133-147, 2019.

REYES, H.S.R.; PÉREZ M., C.; PÉREZ, M.L.; et al. Efectos de la aplicación de

bactérias lácticas y ácido láctico en la ganancia de peso y mortalidad en pollos. **Revista Científica** - Facultad de Ciencias Veterinarias, Zulia, v.10, n.4, p.310-314, 2000.

RIBEIRO, P.R. **Efeito da adição de diferentes níveis de ácido fumárico na ração de suínos sobre o desempenho e morfologia duodenal**. 75f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197-215, 2000.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, n.5-6, p.563-572, 1998.

SAMOUR, J., NALDO, J., LIBANAN, N.; RAHMAN, H.; SAKKIR, M. Age-related hematology and plasma chemistry changes in captive Masai ostriches (*Struthiocamelus massaicus*). **Comparative Clinical Pathology**. v.20, p.659–667, 2011.

SANTANA, E.S.; DE OLIVEIRA, F.H.; BARNABÉ, A.C.S.; MENDES, F.R.; ANDRADE, M.A. Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Enciclopédia Bioesfera**. 2011.

SANTOS, A.L.; SAKOMURA, N.K.; FREITAS, E.R.; FORTES, C.M.L.S.; CARRILHO, E.N.V.M.; FERNANDES, J.B.K. Estudo do crescimento, desempenho, rendimento de carcaça e qualidade de carne de três linhagens de frango de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.5, p.1589-1598, 2005.

SANTOSO U.; TANAKA, K.; OHTANI, S. 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.

SATO R.N.; LODDI M.M. & NAKAGHI L.S.O. Uso de antibiótico e/ou probiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, sup.4, v.37, 2002.

SAUVEUR, B.; REVIERS, M. **Reproduction des volailles et production d'oeufs**. Paris: Inra, Station de Recherches avicoles. 455p, 1988.

SCHMIDT, E. M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A.C. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v 12, n. 3, p.9-20, 2007.

SCHETTINO, D.N.; CANÇADO, S.V.; BAIÃO, N.C.; LARA, L.J.C.; FIGUEIREDO, T.C.; SANTOS, W.L.M. Efeito do período de jejum pré-abate sobre o rendimento de carcaça de frango de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.5, p.918-924, 2006.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.62, p.775-806, 1998.

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

SEN, S.; LINGALE, S.L.; KIM, Y.W.; KIM, J.S.; KIM, K.H.; LOHAKARE, J.D.; KIM, E.K.; KIM, H.S.; RYU, M.H.; KWON, K.; CHAE, B.J. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in Veterinary Science**, v.93, n. 1, p.264-268, 2012.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.514-525, 2006.

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

SIERRA, I. Producción de cordero joven y pesado en la Raza Aragonesa. **Zaragoza: I.E.P.G.E.**, n. 18, 1973.

SILVA, E. N. Probióticos e Prebióticos na Alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, **Anais**, Campinas: FACTA, p.242, 2000.

SILVA, C. R.; PINHEIRO, A. L. B. C. Utilização de probióticos como melhoradores de desempenho em aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n.6, p.690-706, 2008.

SILVA JÚNIOR, V.A.; VIEIRA, C.F.P.; PAULA, T.A.R.; PALMA, M.B.; AMORIM, A.A.; MANHÃES, R.C. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development**. v. 46, p.157-166, 2006.

SOUZA, L.F.A.; ARAÚJO, D.N.; STEFANI, L.M.; GIOMETTI, I.C.; CRUZPOLYCARPO, V.C.; POLYCARPO, G.; BURBARELLI, M.F. Probiotics on performance, intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens raised with lower or higher environmental challenge. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v. 50, p. 35-41, 2018.

SOROKULOVA, I. B.; PINCHUK, I. V.; DENAYROLLES, M.; OSIPOVA, I. G.; HUANG, J. M.; CUTTING, S.; URDACI, M. C. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, p.954-963, 2008.

STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E.A. **O mundo dos micróbios**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 741p, 1969.

STRINGHINI, J.H; LABOISSIÉRE, M.; MURAMATSU, K.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de quatro linhagens de frangos de corte criadas em Goiás. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.1, p.183-190, 2003.

SZAJEWSKA, H.; SETTY, M.; MRUKOWICZ, J.; GUANDALINI, S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. **Journal Pediatric Gastroenterol Nutrition**. v.42, n.5, p.454-75, 2006.

TAM, N. K. M.; UYEN, N. Q.; HONG, H.A.; DUC, L.H.; HOA, T. T.; SERRA, C. R.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.2692-2700, 2006.

TANNOCK, G.W. Molecular assessment of intestinal microflora. **American Journal of Clinical Nutrition**, V.73, p.410-414, 2001.

TOURNUT, J.R. Probiotics. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECHNIA, **Anais...** Botucatu: SBZ, p.179-199, 1998.

TRALDI, A.B.; OLIVEIRA, M.C.; DUARTE, K.F.; MORAES, V.M.B. Avaliação de probióticos na dieta de frangos de corte criados em cama nova ou reutilizada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.660-665, 2007.

UNI, Z.; FERKET, R.P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n.1, p.101-111, 2004.

UNI, Z.; PERRY, G.C. Early development of small intestinal function. In: **Graham CP (ed) Avian gut function in health and disease, 3rd.** p.29-42, 2006.

UNI, Z.; ZAIGER, G.; GAL-GARBER, O.; PINES, M.; ROZENBOIM, I.; REIFEN, R. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chicken small intestine. **British Poultry Science**. V.41, n.4, p.410-415, 2000.

UPADHAYA, S. D.; RUDEAUX, F.; KIM, I.H. Effects of inclusion of *Bacillus subtilis* (Gallipro) to energy- and protein-reduced diet on growth performance, nutrient digestibility, and meat quality and gas emission in broilers. **Poultry Science**, v.98, p.2169-2178, 2019.

VAN LAACK, R. L.; LIU, C. H.; SMITH, M. O.; LOVEDAY, H. D. Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. **Poultry Science**, v. 79, n. 7, p. 1057-1061, 2000.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 673-687, 2007.

VOGADO, G.M.S.; VOGADO, K.T.S.; FONSECA, W.J.L.; OLIVEIRA, A.M.; VOGADO, W.F.; LUZ, C.S.M. Evolução da Avicultura Brasileira. **Nucleus Animalium**, Piauí, v.8, n.1, p. 49-58, 2016.

WOLFENDEN, R.E., PUMFORD, N.R., MORGAN, M.J., SHIVARAMAIAH, S., WOLFENDEN, A.D., TELLEZ, G. & HARGIS, B.M. Evaluation of a screening and selection method for *Bacillus* isolates for use as effective direct-fed microbials in commercial poultry. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.4, p.317-323, 2010.

WU, B.Q., ZHANG, T., GUO, L.Q. & LIN, J.F. Effects of *Bacillus subtilis* KD1 on broiler intestinal flora. **Poultry Science**, v.90, n.11, p.2493-2499, 2011.

WULFF, K.N.G. **Probióticos a base de *Bacillus* spp. na cama e na ração de frangos de corte**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Paraná.

ZHANG, A.W., LEE, B.D., LEE, S.K., LEE, K.W., AN, G.H., SONG, K.B. & LEE, C.H. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. **Poultry Science** v.84, n.7, p.1015-1021, 2005.

ZHANG, Z. F., ZHOU, T. X., AO, X., KIM, I. H. Effects of  $\beta$ - glucan and *Bacillus subtilis*, on growth performance, blood profiles, relative organ weight and meat quality in broilers fed maize– soybean meal based diets. **Livestock Science**, v.150, p.419–424, 2012.

ZHOU, X., WANG, Y., GU, Q., LI, W. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. **Poultry Science**, v.89, p. 588-593, 2010.

ZHOU, M.; ZENG, D.; NI, X.; TU, T.; YIN, Z.; PAN, K.; JING, B. Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. **Lipids Health Disease**. v. 15, n. 1, p. 1-10, 2016.