MARCOS ALEXANDRE IVO

ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DA TONSILA CECAL DE FRANGOS SPF
TRATADOS COM PRODUTOS COMERCIAIS DE EXCLUSÃO COMPETITIVA, E
DESAFIADOS COM ***SALMONELLA ENTERITIDIS***, OBSERVADOS ATRAVÉS DE
MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

SÃO PAULO

2009

MARCOS ALEXANDRE IVO

Estudo da ultraestrutura da tonsila cecal de frangos SPF tratados com produtos comerciais de exclusão competitiva, e desafiados com ***Salmonella Enteritidis***, observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2167
FMVZ

Ivo, Marcos Alexandre

Estudo da ultraestrutura da tonsila cecal de frangos SPF tratados com produtos comerciais de exclusão competitiva, e desafiados com *Salmonella enteritidis*, observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) / Marcos Alexandre Ivo. – São Paulo : M. A. Ivo, 2009.

67 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Exclusão competitiva. 2. Probióticos. 3. *Salmonella enteritidis*. 4. Tonsila cecal.
5. Aderência. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo de *Salmonella Typhimurium* de origem aviária: perfil genotípico, colonização, invasão e ativação da resposta imune”, protocolado sob o nº1197/2007, utilizando 240 (duzentos e quarenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado aprovado “ad referendum.

We certify that the Research “Study of *Salmonella Typhimurium* of avian origin: genotypy profile, colonization, invasion and immune response activation”, protocol number 1197/2007, utilizing 240 (two hundred forty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved “ad referendum” of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 – 05508-270 – Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”. Fax: (11) 3032-2224 – fones: (11) 309107676/7671 – e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: IVO, Marcos Alexandre

Título: Estudo da ultraestrutura da tonsila cecal de frangos SPF tratados com produtos comerciais de exclusão competitiva, e desafiados com **Salmonella Enteritidis**, observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Anatomia dos Animais Domésticos
e Silvestres da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS:

Aos meus pais pelos ensinamentos ao longo de minha vida, pela educação recebida, pelo incentivo ao estudo e por seu amor incondicional;

À minha esposa pela dedicação, amor e compreensão, lutando a meu lado e por acreditar sempre, que unidos teríamos forças para enfrentarmos todos os obstáculos que encontrarmos ao longo de nossas vidas;

Aos meus amigos que compreenderam as horas de ausência e apoiaram, aceitando e incentivando a conquista de um objetivo maior;

À minha irmã, meus cunhados, meu sogro e minha sogra que sempre estiveram presentes incentivando e colaborando com o que fosse necessário para o sucesso deste trabalho.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço ao Professor Doutor Antônio José Piantino Ferreira pela oportunidade do aprendizado, compartilhando seus conhecimentos profissionais, guiando este trabalho, pela paciência que só a experiência é capaz de proporcionar e por sua amizade;

À Professora Doutora Claudete Serrano Astolfi Ferreira pelo conhecimento e orientação no trabalho de laboratório, apoiando e ajudando sempre os colegas com carinho;

Aos amigos do laboratório e colegas da pós-graduação pelo convívio e troca de conhecimentos;

À Professora Doutora Maria Angélica Miglino pela oportunidade do ingresso no Mestrado e pela confiança;

À Sandra, técnica responsável pelo laboratório de M.E.V. do Departamento de Anatomia, pela ajuda durante a realização do trabalho no processamento e na captação das imagens para ilustração do trabalho;

Ao Corpo Docente e aos amigos da UNIFEOB que apoiaram e incentivaram por compreender a necessidade do aperfeiçoamento e o retorno que os novos conhecimentos podem proporcionar aos alunos.

Aos meus amigos que compreenderam as horas de ausência e apoiaram, aceitando e incentivando a conquista do meu objetivo.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

RESUMO

IVO, M. A. **Estudo da ultraestrutura da tonsila cecal de frangos SPF tratados com produtos comerciais de exclusão competitiva, e desafiados com *Salmonella* Enteritidis, observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).** [Study of ultrastructure in cecal tonsil of SPF chickens treated with commercial products of competitive exclusion, and challenged with *Salmonella* Enteritidis, observed by scanning electron microscopy (SEM)]. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a eficiência da aderência de produtos de exclusão competitiva e de probiótico sobre a tonsila cecal de frangos SPF, com idade de um a doze dias. Através da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se a ação destes produtos comerciais com relação a proteção ao epitélio, quando desafiados com *Salmonella* Enteritidis. O delineamento experimental foi dividido em cinco (05) grupos, sendo o grupo T1 o controle negativo, o grupo T2 recebeu o produto de exclusão competitiva Aviguard, o grupo T3 recebeu o produto de exclusão competitiva Broilact, o grupo T4 recebeu o probiótico Biotop e o grupo T5 o controle positivo. Após 12 horas do tratamento com os produtos de exclusão competitiva ou probiótico as aves foram infectadas, por via oral, com *S. Enteritidis*. Os resultados obtidos mostraram que os produtos de exclusão competitiva e probiótico apresentaram uma maior eficiência em estabelecer uma microbiota protetora contra *S. Enteritidis*, e que a adição destes pode produzir um efeito de melhor índice zootécnico, quando comparado com as aves que foram desafiadas com *S. Enteritidis* e que apresentaram um ganho de peso inferior.

Palavras-chave: Exclusão Competitiva. Probióticos. *Salmonella* Enteritidis. Tonsila Cecal. Aderência.

ABSTRACT

IVO, M. A. **Study on ultrastructure of cecal tonsil of SPF chickens treated with commercial competitive exclusion products and challenged with *Salmonella Enteritidis***. [Estudo da ultraestrutura da tonsila cecal de frangos SPF tratados com produtos comerciais de exclusão competitiva, e desafiados com *Salmonella Enteritidis*, observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)]. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The aim of this study was to evaluate the ultra structure of the cecal tonsil in SPF chicks using scanning electron microscopy, determining the efficacy of competitive exclusion products and probiotic and its protection in cecal epithelium against an oral challenge with *Salmonella Enteritidis*. The experimental design included five groups: T1 negative control, T2 chicks treated with Aviguard, T3 chicks treated with Broilact, T4 chicks treated with Biotop, and, T5 positive control. After 12 hours of treatment with competitive exclusion products or probiotic the chicks were infected orally with *S. Enteritidis*. Results showed that treated groups had a protective effect stimulating the establishment of the resident microflora against pathogenic bacteria. Treated chicks showed high weight gain when compared to chicks challenged.

Keywords: Competitive exclusion. Probiotics. *Salmonella Enteritidis*. Cecal tonsil. Adherence.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

cm	centímetro
g	grama
M	molar
mL	mililitro
pH	potencial hidrogeniônico
X	vezes
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
° C	graus Celsius

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Aspectos anatômicos e funcionais do trato digestório.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	AVES	22
3.2	INFECÇÃO EXPERIMENTAL	24
3.2.1	DESAFIO.....	24
3.2.2	COLHEITA DE MATERIAL	24
3.2.3	PREPARO DE MATERIAL PARA MICRÓSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 24	
3.2.4	DESEMPENHO DAS AVES.....	25
4	RESULTADOS	26
4.1	MICRÓSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	26
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIA	62
	APENDICE A.....	67

1 INTRODUÇÃO

A pouca diversidade da microbiota intestinal de aves recém nascidas, que são consideradas como um fator limitante para o crescimento, também possibilitam a colonização intestinal por patógenos entéricos (LODDI, 2001). Da mesma forma, a ausência de contato com a microbiota natural, logo após o nascimento, pode afetar o desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) e, por consequência, prejudicar o crescimento das aves (GHADBAN, 2002; POPPI, 2005). Conforme Gill, (2003) a microbiota normal do intestino atua como um mecanismo de defesa por todo o aparelho digestório e a mesma inicia a colonização logo após o nascimento.

Sabe-se que o desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de dois eventos citológicos primários associados: a renovação celular (proliferação e diferenciação) resultante de divisões mitóticas sofridas por células “totipotentes”, localizadas na cripta e ao longo dos vilos (UNI, 1998; UNI, 2000) e a perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos. O equilíbrio entre esses dois processos é determinado por uma taxa de renovação contínua.

Segundo Yamauchi e Ishiki (1991), a densidade dos vilos é diferente nas várias porções intestinais (duodeno, jejuno e íleo), pois o número destes são reduzidos aos 10 dias de idade, independente da raça. O fato não implica em menor capacidade de absorção e sim em maior desenvolvimento do vilo. Assim, o número de vilos/área é reduzido em função da idade, sendo observado uma redução maior no frango de corte em relação à poedeira. De acordo com Macari (1999) o número de vilosidades por área e seu tamanho, bem como o número de microvilos, por segmento do trato digestório (intestino delgado) confere-lhes características próprias, sendo que na presença de nutrientes a capacidade de absorção do segmento será diretamente proporcional ao número de vilos presentes, tamanho dos vilos e área de superfície disponível para a absorção.

Normalmente, o epitélio intestinal age como uma barreira natural contra bactérias patogênicas e substâncias tóxicas presentes na luz intestinal. Distúrbios na microbiota normal ou nas células epiteliais intestinais, causados por algum tipo de estresse, patógenos, substâncias químicas, radiação, podem alterar a permeabilidade desta barreira natural, facilitando a invasão de patógenos e outras substâncias nocivas, modificando o metabolismo, a capacidade de digestão e

absorção de nutrientes, além de causar inflamações crônicas na mucosa intestinal (PELICANO, 2003).

As bactérias no TGI podem ser encontradas associadas intimamente com o epitélio ou livres na luz intestinal. As bactérias livres devem multiplicar-se rapidamente para compensar a eliminação pelo peristaltismo intestinal, ou ainda agregarem-se às demais bactérias que se encontram aderidas na mucosa intestinal. Esta variada composição da microbiota intestinal pode ser benéfica ou maléfica para o hospedeiro, dependendo da natureza e da quantidade de microorganismos (DANIS; ANDRESON, 2002; PATTERSON; BURKHOLDER, 2003; MAI, 2004; KLOSE et al., 2006). Os efeitos maléficos seriam: diarreia, infecções, distúrbios hepáticos, carcinogênese, putrefação intestinal, redução da digestão e absorção de nutrientes. Já os benefícios estariam vinculados à inibição da multiplicação de bactérias patogênicas, estímulos ao sistema imune, síntese de vitaminas, melhor digestão e absorção dos nutrientes (FERREIRA et al., 1990).

A concepção de que o desenvolvimento da microbiota intestinal poderia proporcionar prejuízos em lotes de frangos, seja pela concorrência ao alimento ou devido a lesões provocadas diretamente na mucosa intestinal por bactérias patogênicas, levou à utilização de antibióticos, os quais foram erroneamente denominados de promotores de crescimento, tendo como principal função, a redução da carga microbiana no TGI (FURLAN, 2004). Entretanto, com a preocupação de que estes aditivos poderiam induzir resistência a patógenos importantes para os seres humanos, a legislação de muitos países tem proibido a utilização dos mesmos em ração animal (LIMA, 2008).

No Brasil, na década de noventa, o Ministério da Agricultura publicou a Portaria número 159 de 13/06/92, proibindo o uso de determinados antibióticos como aditivos alimentares nas rações animais. Desde então, o Ministério da Agricultura vem publicando novas Portarias proibindo o uso de outros antibióticos (Portaria número 448 de 10/09/98), a avoparcina (Portaria número 819 de 16/10/98), os arsenicais, antimonianais (Portaria número 31 de 29/01/2002), o cloranfenicol e os nitrofuranos (Instrução Normativa número 38 de 08/05/2002) (UTIYAMA, 2004).

Em decorrência desse fato, novos aditivos alimentares começaram a ser testados e utilizados para alimentação animal como os probióticos, prebióticos, simbióticos, exclusão competitiva, enzimas, entre outros (ADLERBERTH et al., 2000).

Probiótico é uma palavra derivada do grego, Pro: a favor da vida e bio: vida, ou seja, a favor da vida. Já, em contraposição, o termo antibiótico significa contra a vida (GHADBAN, 2002). Probióticos são produtos constituídos por microorganismos vivos que, uma vez introduzido no organismo animal, influenciam benéficamente o hospedeiro, através da melhoria do balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). A história desses aditivos é conhecida há centenas de anos, mas somente no início do século passado, foi estudado racionalmente e pesquisado com bases científicas. O uso de organismos probióticos surgiu no Oriente Médio, onde médicos prescreviam iogurtes e outros leites fermentados como terapêutica para afecções do trato gastrointestinal e também como estimulante do apetite (BUTOLO, 2001; FURLAN, 2004; ISOLAURI et al., 2004).

Gibson e Roberfroid (1995) definiram prebióticos como ingredientes alimentares não digeríveis na porção proximal do trato digestório, que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas. A principal ação dos prebióticos é estimular o crescimento ou ativar o metabolismo de algum grupo de bactérias do trato intestinal (MAI, 2004), portanto, de acordo com esses autores, para que um componente do alimento seja considerado um prebiótico, este não pode ser hidrolisado ou absorvido nos segmentos iniciais do trato digestório, devem ser capazes de alterar a microbiota intestinal, favorecendo uma composição mais saudável e com efeitos benéficos.

As substâncias mais estudadas como aditivos na alimentação animal são os oligossacarídeos, mananoligossacarídeos, frutoligossacarídeos. Tais aditivos são obtidos a partir da parede celular de levedura que consiste principalmente em proteínas e carboidrato, os quais contém dois principais açúcares (glucose e manose) em proporções semelhantes (GIBSON; RBERFROID, 1995).

Mais recentemente deu-se início ao uso do termo simbióticos. Este se faz pela associação de prebióticos e probióticos em um só produto. Desta forma, pode-se fornecer componentes da microbiota intestinal e também substâncias prebióticas específicas que, em conjunto, podem estimular o desenvolvimento e a atividade desta mesma microbiota, podendo potencializar o efeito de ambos os componentes.

Com a ausência de métodos mais eficientes no controle das salmoneloses aviárias e de contra indicações na utilização de antibióticos, devido a resistência em humanos, surgiram as pesquisas de métodos alternativos, dentre eles, o uso de

probióticos e produtos de exclusão competitiva (EC) (BARROS, 2003; NOUJAIM, 2005).

Os probióticos são compostos por microorganismos vivos que fornecidos às aves, beneficiam através das propriedades existentes na microbiota natural (FERREIRA et al.1998), além de melhorar os índices zootécnicos, econômicos e a redução da colonização intestinal por alguns patógenos incluindo *Salmonella* spp.(ANDREATI FILHO et al., 2000, 2008).

O termo Exclusão Competitiva foi definido pela primeira vez em 1973 por Nurmi e Rantala, após o surto por *Salmonella* Infantis ocorrido na Finlândia. Atualmente, exclusão competitiva é definida como a capacidade de uma determinada população microbiana se estabelecer no trato digestório, possibilitando uma maior eficiência em determinado ambiente ou de produzir metabólitos que sejam prejudiciais a outros microorganismos (DAY, 1992; BARROS, 2003), também reduzindo a exposição de consumidores a toxi-infecções alimentares (BAILEY, 2000).

As aves possuem mecanismos naturais de proteção, no trato digestório, contra infecções, constituídas por uma microbiota intestinal normal, produzindo fatores antimicrobianos como as bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e estabelecendo assim um sistema de exclusão competitiva.

A microbiota intestinal é composta por inúmeras espécies bacterianas, responsáveis por fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro. A administração de probióticos ou produtos de exclusão competitiva, fornecidas, às aves pode proporcionar proteção a patógenos, devido a grande eficácia na ocupação dos pontos de ligação localizados nos enterócitos, de uma maneira física ou, por produção de algum metabólito que seja tóxico a outros microorganismos, (FILHO; REVOLEDO; FERREIRA, 2008).

A suscetibilidade das aves à colonização por *Salmonella* spp. é maior durante o início da vida, e reduzida a medida que a microbiota intestinal se desenvolve. Sabe-se que *Salmonella* spp. não pertence a microbiota normal das aves, mas são capazes de colonizar o trato digestório destas e permanecerem durante todo o período de criação. Normalmente, se localizam preferencialmente nas tonsilas cecais, na porção cranial do intestino delgado, proventrículo e moela (REVOLLEDO, 2005).

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a aderência de produtos de exclusão competitiva e de probiótico sobre as tonsilas cecais de frangos SPF.

Através da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se a ultraestrutura de produtos de exclusão competitiva e de probiótico ao epitélio de tonsilas cecais, a eficácia destes produtos frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis, e, comparou-se o ganho de peso entre os tratamentos propostos para esse experimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para uma melhor compreensão do presente trabalho, faremos uma apresentação de como ocorre o trato digestório das aves, assim como, as funções de cada órgão e a nomenclatura utilizada para sua identificação.

2.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS DO TRATO DIGESTÓRIO

A anatomia do trato digestório das aves diferencia-se dos mamíferos, principalmente, pela presença de um Inglúvio (papo) no esôfago e pela existência de um estômago muscular (moela). A boca e a faringe não são bem delimitadas nas aves. Na maioria das espécies não existe o palato mole e o palato duro comunica-se com a cavidade nasal (SISSOM, 1975; FURLAN, 2000).

As aves não possuem dentes e a sua função é realizada pelo bico córneo e pela moela, havendo uma grande variedade de adaptações do bico e da língua. As glândulas salivares e papilas gustativas estão presentes em número e localização variáveis (FURLAN, 2000). As dimensões do trato digestivo variam consideravelmente entre as espécies, dependendo dos hábitos alimentares (SOUZA-SOARES; SIEWERDT 2005).

O esôfago das aves é comparativamente longo e de maior diâmetro. A primeira dilatação ventral do esôfago é o inglúvio (papo), que está presente na maioria das espécies, com exceção das corujas e das espécies que se alimentam de insetos (DUKES, 1996; FURLAN, 2000). Nesta região anatômica, o alimento é umedecido e amaciado, mas pouca ou nenhuma digestão é realizada e também são encontrados receptores de estiramento que estariam envolvidos nos mecanismos de controle da ingestão de alimentos (DUKE, 1996; FURLAN, 2000).

O estômago glandular ou proventrículo atua primordialmente como órgão de secreção, enquanto o estômago muscular é adaptado para a trituração nas espécies que ingerem alimentos duros ou para misturar as secreções digestivas com o alimento, nas espécies carnívoras (DUKE, 1996). O estômago muscular compõe-se de dois pares denominados músculos intermediários e músculos laterais ou de

acordo com a nova nomenclatura, pares de músculos grosso e fino, respectivamente (FURLAN, 2000). A camada interna da moela apresenta uma submucosa firme com revestimento de um complexo de proteína-polissacarídeo resistente e abrasivo, com função de proteger a mucosa contra danos provocados pela pressão dos grãos e alimentos sobre a superfície quando da contração da moela, bem como, contra o efeito corrosivo das enzimas e ácidos que fluem do estômago glandular (FURLAN, 2000; SOUZA-SOARES e SIEWERDT 2005; ITO et al., 2004).

O intestino delgado é a porção mais longa do sistema digestório, responsável pela digestão final do alimento e absorção de nutrientes (BOLELI et al., 2002). A mucosa intestinal apresenta projeções microscópicas denominadas de vilos, que são constituídos por três tipos de células, funcionalmente distintas: enterócitos, células caliciformes e as células enteroendócrinas.

Os Enterócitos são células que respondem pela digestão final do alimento e pelo transporte trans-epitelial de nutrientes a partir do *lúmen*. Estas células apresentam um processo de maturação que ocorre durante o processo de migração da cripta (base) para o ápice do vilo. Esta maturação é dependente de síntese de proteínas estruturais, as quais são codificadas pelo genoma de células intestinais (MAIORKA, 2000; SOUZA-SOARES; SIEWERDT 2005).

As Células Caliciformes são secretoras de glicoproteínas, que tem a função de proteger o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta.

As Células Enteroendócrinas são produtoras de hormônios peptídicos (gastrina, secretina e colecistoquinina) e monoaminas biogênicas que atuam na regulação da digestão, absorção e utilização de nutrientes.

Quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilo e por consequência, maior a área de absorção de nutrientes. Yamauchi & Isshiki (1991) mostraram que a densidade de vilos/área era reduzida com o aumento da idade das aves. Este resultado evidencia que com o aumento da idade das aves, ocorre diminuição do tamanho do vilo (MAIORKA, 2000).

Outro fator relevante para a absorção de nutrientes na membrana luminal é a quantidade de microvilos existentes nos enterócitos. Os microvilos atuam como um amplificador de área para a absorção de nutrientes e são projeções da membrana luminal do enterócito.

Estruturas secundárias e determinados compostos também exercem papel importante no processo de digestão, absorção de nutrientes e proteção do trato gastrointestinal (TGI) destes animais, como o glicocálix e o muco (DUKE, 1996).

Denomina-se Glicocálix os prolongamentos de polissacarídeos presentes na superfície do enterócito que penetram no *lúmen* intestinal. Estas estruturas apresentam funções importantes, sendo uma delas, a manutenção da camada aquosa próxima à mucosa intestinal em pH neutro, que permite a ação de enzimas presentes na membrana. Outra função do glicocálix está associada à presença de receptores que são capazes de ligar-se a bactérias patogênicas ou não patogênicas (DUKE, 1996). Neste sentido para manter a sanidade da mucosa intestinal (BOLELI et al., 2002).

O Muco é composto de glicoproteína insolúvel em água com função protetora relacionada basicamente contra a ação mecânica. Devido a grande aderência à superfície, o muco não é totalmente removido, mesmo durante a ação de forças mecânicas vigorosas que ocorrem durante a digestão, protegendo o epitélio durante a passagem de alimento e com ação lubrificante sobre alimentos sólidos (DUKE, 1996).

A camada de muco apresenta papel importante também na proteção contra infecções, pois atua como uma barreira protetora que impede o contato direto de microorganismos com as células epiteliais. O muco do intestino delgado e ceco contém uma rica população de bactérias e protozoários, as quais, ligam-se as glicoproteínas e não se aderem à mucosa. Os componentes da mucina funcionam como falsos receptores para os microorganismos, fazendo com que os mesmos sejam envoltos pela camada de muco, não expressando sua capacidade patogênica. A espessura da camada de muco é variável de espécie para espécie. Situações como jejum ou alterações de dieta, podem ocasionar redução da camada protetora de muco e propiciar a ação de bactérias e protozoários patogênicos, conseqüentemente, o desencadeamento de processos patológicos lesivos na mucosa (NOY; SKLAN, 1998).

A existência de algum tipo de agressão à mucosa, aumenta o número de células caliciformes nos vilos; aumentando a capacidade secretora e se depletam de secreção durante um processo infeccioso no intestino delgado. Esta atividade aumentada parece ser conseqüência da ação de enterotoxinas que estimulam a atividade secretora de células caliciformes (HERDT, 1993).

A viscosidade do conteúdo intestinal também possui papel de extrema importância para a manutenção da integridade das células epiteliais do intestino, por impedir rupturas na camada de muco.

Na eclosão, o TGI das aves está anatomicamente completo, mas sua capacidade de digestão está imatura, quando comparada à de aves adultas. O TGI sofre então um processo de maturação que envolve adaptações morfológicas e fisiológicas. O intestino delgado aumenta em peso mais rapidamente que a musculatura corporal. Este processo de rápido crescimento em relação ao peso corporal é verificado desde o terço final da incubação (MAIORKA et al., 2000), alcançando o máximo desenvolvimento relativo do 6° ao 8° dia em perus e do 4° ao 8° dia em frangos (NOY; SKLAN, 1998). Isto fortalece a premissa de que a adequada alimentação na primeira semana de idade da ave tem papel relevante no desempenho da mesma.

Localizado na junção dos intestinos grosso e delgado estão os cecos que, nas aves, em geral são em número par, ao contrário de mamíferos. Suas dimensões são influenciadas pelos hábitos alimentares e não estão presentes em todas as espécies. O intestino grosso das aves é relativamente curto e não é bem demarcado em reto, cólon e cloaca, como nos mamíferos. O cólon cujo prolongamento denomina-se reto é um tubo curto e estreito que se estende da junção íleo-cecocolica até a cloaca, separada do cólon por uma constrição formada por músculo circular espesso. Assim, a cloaca é um compartimento comum aos aparelhos reprodutivos, digestivo e urinário (FURLAN, 2000).

O trato gastrointestinal é innervado por fibras do sistema parassimpático, e pelas fibras do sistema simpático (BAUMELL, 1981).

As contrações antiperistálticas se originam na cloaca e ocorrem a uma frequência de dez a quatorze contrações por minuto em galinhas e perus (ITO, 2004). O movimento antiperistáltico cessa imediatamente antes da defecação, durante o qual, todo o cólon parece contrair-se simultaneamente. Os bolos fecais do ceco na maioria das espécies de aves podem ser distinguidos facilmente por sua cor marrom achocolatada e textura homogênea.

O ritmo diurno na motilidade do ceco acontece com maior frequência de contrações diárias (cerca de uma contração por minuto), ocorre no fim da tarde; a frequência mais baixa (cerca de meia contração por minuto) ocorre logo após o desligamento das luzes no aviário. O tempo necessário para que o alimento passe

por todo o canal alimentar, geralmente é maior nas espécies herbívoras e menor nas carnívoras e frugívoras (SOUZA-SOARES; SIEWERDT 2005).

A velocidade da passagem pode ser influenciada pela resistência, pela consistência, e pelo conteúdo de água dos alimentos, além da quantidade consumida. Aparentemente, a idade da ave também pode influenciar a velocidade da passagem, já que o alimento passa pelo trato digestivo das aves jovens mais rápido do que nas adultas. Duas horas e meia após a ingestão de um contraste de óxido de cromo pela galinha, este pode ser detectado nas excretas e a maior parte pode ser recuperada em aproximadamente vinte e quatro horas. A excreção cecal do marcador pode, entretanto, ser detectada dois a três dias após a ingestão do mesmo (BOLELI, 2002).

Apenas cerca de 10% da maioria das dietas ingeridas pelos galiformes recebe ação cecal. Apesar disso, acredita-se que várias funções importantes ocorram no ceco; a mais notável delas sendo a digestão microbiana da celulose.

A absorção de água dos conteúdos cecais parece ser a principal função do ceco. A síntese microbiana de vitaminas também ocorre no ceco, mas as vitaminas aparentemente não são absorvidas pelo hospedeiro. Sintomas de deficiências vitamínicas, entretanto, não foram menos severas nas aves criadas convencionalmente, indicando que elas obtiveram pouco benefício das vitaminas sintetizadas por seus microorganismos cecais (MAIORKA, 2000; SOUZA-SOARES; SIEWERDT 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado no Centro Experimental de Patologia Aviária do Departamento de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo – USP.

3.1 AVES

Para este estudo foram utilizados 50 pintinhos SPF (*Specific Patogenic Free*), machos, com um dia de idade provenientes do Biotério de aves SPF do Laboratório Biovet S. A.

As aves foram recebidas com um dia de idade e alojadas, aleatoriamente, em gaiolas de 90cm x 120cm, no Centro Experimental de Patologia Aviária da FMVZ-USP, em São Paulo. As gaiolas foram previamente analisadas quanto à presença de *Salmonella* spp.

As aves foram aquecidas com temperatura variando entre 30 - 34 °C e alimentadas com ração comercial sem aditivos medicamentosos, sem anticoccidianos (Apêndice 1), com água “*ad-libidum*” durante o período experimental.

Os tratamentos foram distribuídos da seguinte forma:

Tratamento 1 (T1) - recebeu diretamente no ingluvío, solução salina 0,85% estéril com o auxílio de uma sonda esofágica..

Tratamento 2 (T2) - recebeu o produto de exclusão competitiva Aviguard e após doze horas foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis, com o auxílio de uma sonda oral, diretamente no ingluvío, (Aviguard + *Salmonella* Enteritidis).

Tratamento 3 (T3)- recebeu o produto de exclusão competitiva Broilact e após doze horas foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis com o auxílio de uma sonda oral, diretamente no ingluvío (Broilact + *Salmonella* Enteritidis).

Tratamento 4 (T4) - recebeu o probiótico Biotop e após doze horas foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis com o auxílio de uma sonda oral, diretamente no ingluvío (Biotop + *Salmonella* Enteritidis).

Tratamento 5 (T5) - este grupo apenas recebeu o desafio com *Salmonella* Enteritidis após 12 horas do alojamento, com o auxílio de uma sonda oral, diretamente no ingluvío. Os grupos experimentais estudados serão apresentados na forma de quadro, com suas devidas denominações, para que sejam melhor caracterizados.

TRATAMENTOS	DENOMINAÇÕES
Tratamento 1 (T1)	Controle Negativo (CN)
Tratamento 2 (T2)	Aviguard (AV) + <i>S. Enteritidis</i>
Tratamento 3 (T3)	Broilact (Broi) + <i>S. Enteritidis</i>
Tratamento 4 (T4)	Biotop (Bio) + <i>S. Enteritidis</i>
Tratamento 5 (T5)	<i>S. Enteritidis</i> Controle Positivo (CP).

Quadro 1 – Divisão dos grupos de tratamentos e suas denominações.

Os animais tiveram suas informações escrituradas em protocolo de identificação individual por gaiola e por tratamento.

As aves foram sacrificadas por deslocamento atlanto occipital, a cada 24 horas, após a administração dos produtos de exclusão competitiva e do desafio com *S. Enteritidis*, em um período de dez dias.

Os produtos de exclusão competitiva e o probiótico foram administrados conforme as indicações dos fabricantes.

3.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Para a realização deste experimento as aves receberam os produtos de exclusão competitiva e após 24 horas foram desafiadas com *S. Enteritidis*.

3.2.1 Desafio

As aves receberam 0,2 mL de *S. Enteritidis*, na concentração de 10^6 UFC (unidade formadora de colônia)/mL com a exceção do grupo controle que recebeu solução salina 0,85% estéril.

As aves foram sacrificadas com deslocamento atlanto occipital, a cada 24 horas após a administração dos produtos de exclusão competitiva e do desafio com *S. Enteritidis*.

3.2.2 Colheita de Material

As tonsilas cecais ou os cecos do grupo 5 (*S. Enteritidis*) foram removidas com pinça e tesoura estéril e com o auxílio de um bisturi foi feita uma incisão dorsal nas tonsilas ou nos cecos, para que as mesmas pudessem ser acondicionadas adequadamente em solução de Karnovsky modificada, contendo 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em 0,2 M de cacodilato de sódio, pH 7,4.

3.2.3 Preparo de Material para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As tonsilas cecais ou os cecos do grupo 5 (*S. Enteritidis*) foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante 1 hora em temperatura ambiente, seguida de três lavagens com tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, (WATANABE, 2007).

Em seguida, os tecidos foram tratados em ácido tânico 1% em solução aquosa por uma hora. Prosseguiu-se então com desidratação em etanol em série crescente de concentração, duas vezes por 10 minutos em etanol 50%; 70% e 90%, e quatro vezes por 10 minutos em etanol 100%.

Após estes procedimentos, os fragmentos foram transferidos para cestas permeáveis individualizadas e identificadas, as quais foram mergulhadas em etanol 100% e submetidas à câmara do aparelho de secagem pelo método de ponto crítico e efetuada a substituição total do etanol por dióxido de carbono (CO₂) (MOREIRA, 2001; PELICANO, 2003).

O procedimento seguinte foi colocar as amostras de tecidos cecais com as suas vilosidades voltadas para cima sobre um suporte de alumínio para varredura, aderidos com cola. Após a fixação das amostras, os mesmos foram submetidos ao metalizador para a deposição de uma fina camada de ouro, sobre as preparações, visando prover boa condutividade de carga elétrica nos fragmentos intestinais.

3.2.4 Desempenho das aves

As aves foram pesadas assim que chegaram ao Centro Experimental de Patologia Aviária da FMVZ-USP, foram divididas de acordo com os grupos de tratamento. Ao longo do experimento, as aves foram pesadas nos três primeiros dias e entre seis (06) e 12 dias de idade.

4 RESULTADOS

4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O material processado para a Microscopia Eletrônica de Varredura foi fotomicrografado em vários aumentos, para a visualização de detalhes do tecido epitelial e a ultraestrutura de bactérias à parede do intestino.

Verificaram-se, quarenta e oito horas após o início do tratamento que a tonsila cecal do grupo T2 (tratado com Aviguard e desafiado com *S. Enteritidis*) apresentava bactérias aderidas às vilosidades e entre os vilos, existindo a presença de muco. A figura 1 mostra estes resultados, em um aumento de 300X. Neste tempo estudado, o tecido encontrava-se sem lesão epitelial, a figura 2, em um aumento de 300X, apresenta estes resultados, assim como, as células caliciformes e a presença de muco entre os vilos.

Após 72 horas do tratamento T2 (tratado com Aviguard e desafiado com *S. Enteritidis*), as tonsilas cecais apresentavam uma menor quantidade de microbiota intestinal sobre os vilos, porém o epitélio se apresentava preservado entre os vilos e sobre o tecido. A figura 3, em um aumento de 300X, apresenta estes resultados. Na mesma amostra, em um aumento de 1 300X, observou-se a integridade do epitélio e a aderência de bactérias entre os vilos e na porção proximal da camada basal do epitélio. Assim como, o epitélio com pouca quantidade de muco entre os vilos e no ápice da célula, a figura 4 apresenta estes resultados. A figura 5, em um aumento de 5 000X, mostra uma pequena quantidade de muco aderida aos vilos, sem nenhum tipo de lesão no tecido.

Verificou-se após 8 dias do tratamento T2 (tratado com Aviguard e desafiado com *S. Enteritidis*) que as tonsilas cecais apresentavam os vilos com uma maior aderência bacteriana. O tecido epitelial encontrava-se íntegro, assim como, as células caliciformes. Estes resultados encontram-se na figura 6. Na mesma amostra, em um aumento de 3 000X (figura 7), foi possível se observar a aderência de diferentes bactérias entre os vilos, as criptas e ao longo do epitélio. Este resultado se tornou evidente quando se analisou a amostra em um aumento de 10 000 vezes, onde se

encontrou grande diversidade de bactérias presentes entre os vilos e no epitélio da tonsila cecal. Estes resultados encontram-se na figura 8.

Ao analisar as tonsilas cecais do grupo T2 (tratado com Aviguard e desafiado com *S. Enteritidis*) após 10 dias do tratamento foi possível encontrar a aderência de bactérias da microbiota intestinal sobre os vilos, com uma fina camada de muco nas vilosidades e uma região sugestiva de criptas de células M, a figura 9 mostra estes resultados. A mesma amostra, em um aumento de 20 000X, permitiu que aderência de bactérias do produto de exclusão competitiva pudesse ser observada sobre os vilos e uma fina camada de muco com bactérias aderidas. Possibilitou também verificar a diferença de morfologia entre as células epiteliais e a célula M, na cripta da tonsila cecal. A figura 10 mostra estes resultados.

Figura 1- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 48 horas do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. A seta mostra a presença de bactérias aderidas a vilosidades, aumento de 300x, com barra de 100 μm

Figura 2- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 48 horas do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. A seta mostra o epitélio sem lesão. Observam-se também as células caliciformes e presença de muco entre os vilos. Aumento de 1300 vezes, com barra de 20 μm

Figura 3- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 72 horas do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. Presença de uma menor quantidade de microbiota intestinal sobre os vilos, com o epitélio preservado entre os vilos e sobre o tecido. Aumento de 300 vezes, com barra de 100 μ m

Figura 4- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 72 horas do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. Presença de epitélio íntegro, A seta mostra a aderência de bactérias entre os vilos, na porção proximal da camada basal do epitélio. Tecido com pouca quantidade de muco entre os vilos e no ápice da célula. Aumento de 1300 vezes, com barra de 30 μm

Figura 5- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 72 horas do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. Epitélio íntegro. A seta mostra uma pequena quantidade de muco aderida aos vilos. Aumento de 5000 vezes, com barra de 10 μm

Figura 6- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 8 dias (192 horas) do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. O epitélio apresenta uma maior aderência bacteriana entre os vilos. A seta mostra o tecido epitelial e as células caliciformes sem lesão. Aumento de 700 vezes, com barra de 30 μm

Figura 7- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 8 dias (192 horas) do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. Presença de diversidade bacteriana entre os vilos, as criptas e ao longo do epitélio. Aumento de 3000 vezes, com barra de 10 μm

Figura 8- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 8 dias (192 horas) do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. Grande diversidade bacteriana presente entre os vilos e no epitélio da tonsila cecal. Aumento de 10 000 vezes, com barra de 3 μ m

Figura 9- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 10 dias do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. Aderência de bactérias da microbiota intestinal sobre os vilos, com uma fina camada de muco nas vilosidades. A seta indica a região sugestiva de criptas de células M. Aumento de 10 000 vezes, com barra de 3 μ m

Figura 10- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 10 dias do tratamento (T2) – Aviguard+*Salmonella* Enteritidis. Aderência de bactérias do produto de exclusão competitiva sobre os vilos e uma fina camada de muco com bactérias aderidas. A seta indica a diferença de morfologia entre as células epiteliais e a célula M, na cripta da tonsila cecal. Aumento de 20 000 vezes, com barra de 3 μ m

As tonsilas cecais de aves do grupo T3 (tratado com o produto de exclusão competitiva Broilact e desafiadas com *S. Enteritidis*) mostraram após 48 horas do tratamento, integridade do tecido epitelial, cripta com muco na sua extremidade e aderência de bactérias. A figura 11 apresenta estes resultados. Neste grupo de aves, observou-se após 72 horas, uma pequena quantidade de muco e aderência de bactérias da microbiota sobre os vilos. Estes resultados encontram-se na figura 12.

Verificou-se seis (06) dias após o tratamento, que as tonsilas cecais de aves do grupo 3 apresentavam integridade do tecido epitelial e presença de muco entre os vilos e criptas. A figura 13 mostra estes resultados.

Após oito (08) dias do tratamento, as tonsilas cecais de aves do grupo 3 (tratado com o produto de exclusão competitiva Broilact e desafiadas com *S. Enteritidis*) mostravam a presença de muco sobre uma superfície epitelial maior quando comparada com os demais produtos de exclusão competitiva estudados, observou-se pequenas áreas do tecido epitelial sem a aderência de bactérias da microbiota intestinal. Estes resultados encontram-se na figura 14. A mesma amostra, em um aumento de 3000X, apresentou o tecido epitelial íntegro, a presença de muco e uma diversidade de bactérias entre os vilos. A figura 15 apresenta estes resultados.

As tonsilas cecais de aves que receberam o tratamento 3, após 10 dias deste, mostraram a presença de muco e aderência de bactérias ao tecido epitelial, a figura 16 mostra estes resultados. Esta amostra, em um aumento de 3 000X mostrou a presença de muco com aderência de bactérias, estes resultados encontram-se na figura 17. O aumento de 10.000X, na mesma amostra possibilitou a observação de uma diversidade da microbiota intestinal, existindo na presença de cocos e bastonetes, e de muco aderido ao tecido epitelial da tonsila cecal. A figura 18 apresenta estes resultados.

Figura 11- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 48 horas do tratamento (T3) – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. Tecido epitelial íntegro. Presença de cripta com muco na sua extremidade e aderência de bactérias. Aumento de 10 000 vezes, com barra de 3 μ m

Figura 12- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 72 horas do tratamento (T3) – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. Pequena quantidade de muco e aderência de bactérias da microbiota sobre os vilos, Aumento de 300X, com barra de 100 μm

Figura 13: Fotomicrografia de tonsila cecal, após seis (06) dias do tratamento 3 – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. Integridade do tecido epitelial e muco entre os vilos e criptas. Aumento de 700X, com barra de 30 μm.

Figura 14- Fotomicrografia de tonsila cecal, após oito (08) dias do tratamento 3 – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. Pequenas áreas do tecido epitelial sem a aderência de bactérias da microbiota intestinal. Presença de muco sobre a superfície epitelial. Aumento de 700X, com barra de 30 μm.

Figura 15: Fotomicrografia de tonsila cecal, após oito (08) dias do tratamento 3 – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. É possível se observar no lado direito da figura o tecido epitelial íntegro e, à esquerda da figura, uma diversidade de bactérias e de muco entre o tecido epitelial. Aumento de 3 000X, com barra de 10 μ m.

Figura 16- Fotomicrografia de tonsila cecal, após dez (10) dias do tratamento 3 – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. É possível se observar muco e aderência de bactérias. A seta aponta uma descamação do tecido epitelial. Aumento de 700X, com barra de 30 μm.

Figura 17- Fotomicrografia de tonsila cecal, após dez (10) dias do tratamento 3 – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. Epitélio íntegro, com muco e aderência de bactérias. Aumento de 3 000X, com barra de 10 μm.

Figura 18- Fotomicrografia de tonsila cecal, após dez (10) dias do tratamento 3 – Broilact+*Salmonella* Enteritidis. Presença de bactérias da microbiota intestinal, existindo cocos e bastonetes, e muco aderido ao tecido epitelial da tonsila cecal. Aumento de 10 000X, com barra de 3 μ m.

As tonsilas cecais da ave do grupo 4 (tratado com o probiótico Biotop e desafiadas com *S. Enteritidis*) mostravam, após 24 horas do tratamento, as vilosidades sem aderência de muco e desprovidas de bactérias da microbiota intestinal. Estes resultados encontram-se na figura 19. Em um aumento de 700X, a amostra apresentou integridade do tecido epitelial e a aderência de muco aos vilos, a figura 20 mostra estes resultados.

Verificou-se que após 72 horas do tratamento 4, as tonsilas cecais apresentavam as vilosidades com uma quantidade maior de muco sobre as vilosidades do tecido epitelial e presença bacteriana quando comparada a ave que recebeu o tratamento por 24 horas, e que existia integridade do tecido epitelial. Estes resultados encontram-se na figura 21.

Após (08) dias do tratamento 4, apenas o ápice dos vilos se encontrava com o epitélio exposto, pois existia muco e diversidade de bactérias da microbiota intestinal recobrindo as vilosidades. Observou-se também a presença de tecido de descamação entre o muco. A figura 22 apresenta estes resultados.

As tonsilas cecais da ave do grupo 4, após 10 dias do tratamento, apresentaram algumas células caliciformes com muco e também este entre os vilos da tonsila cecal. Estes resultados encontram-se na figura 23. A mesma amostra, em um aumento de 10 000X, mostra a presença de muco aderido ao tecido epitelial. A figura 24 mostra este resultado.

Figura 19- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 24 horas do tratamento 4 – Biotop+*Salmonella* Enteritidis. A figura mostra as vilosidades sem aderência de muco e desprovidas de bactérias da microbiota intestinal. Aumento de 100X, com barra de 100 μm.

Figura 20- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 24 horas do tratamento 4 – Biotop+*Salmonella* Enteritidis. A figura mostra a integridade do epitélio. As setas indicam a aderência de muco aos vilos. Aumento de 700X, com barra de 30 μm.

Figura 21- Fotomicrografia de tonsila cecal, após 72 horas do tratamento 4 – Biotop+*Salmonella* Enteritidis. A figura apresenta a presença de células epiteliais íntegras. A seta indica uma vilosidade com muco. Aumento de 300X, com barra de 100 μm.

Figura 22- Fotomicrografia de tonsila cecal, após oito (08) dias do tratamento 4 – Biotop+*Salmonella* Enteritidis. Na figura, observa-se o ápice dos vilos, grande quantidade de muco e presença de bactérias da microbiota intestinal. A seta aponta para o tecido de descamação entre o muco. Aumento de 700X, com barra de 30 μm.

Figura 23- Fotomicrografia de tonsila cecal, após dez (10) dias do tratamento 4 – Biotop+*Salmonella* Enteritidis. A figura mostra a presença de muco entre os vilos da tonsila cecal. As setas apontam células caliciformes com muco. Aumento de 700X, com barra de 30 μm.

Figura 24- Fotomicrografia de tonsila cecal, após dez (10) dias do tratamento 4 – Biotop+*Salmonella* Enteritidis. A figura apresenta a presença de muco aderido ao tecido epitelial. Aumento de 10 000X, com barra de 3 μm.

O ceco de ave do grupo 5, ou seja, que recebeu como tratamento *S. Enteritidis*, mostrou, após 24 horas do tratamento, os colares do ceco e que existia uma pequena porção do tecido com aderência conforme indicação. Figura 26: Fotomicrografia do tratamento (T5) controle positivo com aumento de 1300 vezes, observamos que existem, ao longo do tecido, erupções sem presença de muco e desprovidos de microbiota sobre os vilos. Também é possível notar nas células caliciformes, uma pequena liberação de muco, como se observa pela seta. Figura 27: Fotomicrografia do tratamento (T5), com aumento de 10.000 vezes; observamos a célula caliciforme com uma pequena aderência de bactérias e em seu contorno, a formação de fissuras no tecido, sugerindo lesões provocadas por salmonella ao tecido, observados na seta.

48 horas Figura 28: Fotomicrografia do tratamento (T5), com aumento de 300 vezes; observamos que não existe praticamente nenhum tipo de aderência sobre os vilos apesar do tecido se encontrar íntegro, sem lesões sobre o tecido.

As tonsilas cecais de aves do grupo 5, ou seja, que recebeu como tratamento *S. Enteritidis*, foram analisadas e os resultados encontrados foram semelhantes aos do ceco. Assim, como as fotomicrografias do ceco mostraram-se mais nítidas do que as das tonsilas cecais estas foram apresentadas como figuras.

O ceco de ave do grupo 5, após 24 horas do tratamento, mostrou os colares do ceco com pequenas superfícies do tecido epitelial com aderência bacteriana, a figura 25 mostra estes resultados. Em um aumento de 1 300X, o ceco desta ave apresentou ao longo do tecido, erupções sem presença de muco e pequenas superfícies de tecido epitelial com bactérias da microbiota intestinal aderidas. Também foi possível notar nas células caliciformes, uma pequena liberação de muco. Estes resultados encontram-se na figura 26. O aumento de 10 000X, na mesma amostra, permitiu a observação de células caliciformes com uma pequena aderência de bactérias em seu ápice e em seu contorno e que ocorria a formação de fissuras no tecido. A figura 27 apresenta estes resultados.

Verificou-se que o ceco da ave do grupo 5, após 48 horas do tratamento, mostravam a integridade do tecido epitelial, ausência de secreção de muco e apenas pequenos pontos de aderência bacteriana sobre os vilos. Estes resultados encontram-se na figura 28.

Figura 25- Fotomicrografia de ceco, após 24 horas do tratamento 5 – *Salmonella* Enteritidis. A figura apresenta os colares do ceco com pequenas superfícies do tecido epitelial com aderência bacteriana. A seta indica uma superfície do tecido epitelial com bactérias aderidas. Aumento de 300X, com barra de 100 μm

Figura 26- Fotomicrografia de ceco, após 24 horas do tratamento 5 – *Salmonella* Enteritidis. A figura mostra ao longo do tecido, erupções sem presença de muco e pequenas superfícies de tecido epitelial com bactérias da microbiota intestinal aderidas. A seta aponta para célula caliciforme com uma pequena liberação de muco. Aumento de 1 300X, com barra de 30 μm

Figura 27- Fotomicrografia de ceco, após 24 horas do tratamento 5 – *Salmonella* Enteritidis. A figura mostra células caliciformes com uma pequena aderência de bactérias no ápice e em seu contorno. A seta indica a formação de fissuras no tecido. Aumento de 10 000X, com barra de 3 μm

Figura 28- Fotomicrografia de ceco, após 48 horas do tratamento 5 – *Salmonella* Enteritidis. A figura mostra a integridade do tecido epitelial praticamente desprovido de aderência bacteriana sobre os vilos, com ausência de secreção de muco. Aumento de 300X, com barra de 100 μm

4.2 Desempenho das aves

As aves foram pesadas assim que chegaram ao Centro Experimental de Patologia Aviária da FMVZ-USP e cada ave pesou, em média, 45 g. Ocorreu diferença de ganho de peso entre os tratamentos. O grupo 2 (T2), que recebeu o produto de exclusão competitiva comercial Aviguard+S. Enteritidis, apresentou um ganho de peso médio de 213 g em 12 dias de idade. O ganho de peso médio, do grupo 4 (T4), que recebeu o probiótico comercial Biotop+S. Enteritidis, foi de 210 g. O grupo 3 (T3), que recebeu o produto de exclusão competitiva comercial Broilact+S. Enteritidis, apresentou uma média de peso de 197 gramas. O grupo 5 (T5), ou seja, aves que receberam S. Enteritidis, apresentou ganho de peso médio de 176 gramas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 2 e no gráfico 1.

Tabela 2 – Ganho de peso das aves ao longo do experimento, de acordo com os dias de pesagem e do tratamento recebido.

Tratamento	Peso em Gramas									
	1*	2	3	6	7	8	9	10	11	12
T2	45	75,1	82	129	179	123	269	313	341	410
T3	45	66,6	95	144	204	170	202	262	338	406
T4	45	75,2	100,	156	192	165	224	209	305	346
T5	45	66,8	94,6	151	182	175	148	256	221	287

5 DISCUSSÃO

O efeito protetor da microbiota intestinal é fundamental para a saúde do hospedeiro, pois esta pode estimular a imunidade local (KITAGAWA, 2003), contribuir com a nutrição e com a patogenia de enfermidades intestinais (EDENS, 2003).

O seu desenvolvimento depende do contato com o ambiente (PELICANO, 2003). Os resultados encontrados demonstraram que a colonização do epitélio de tonsilas cecais ocorreu mais rapidamente com os produtos de exclusão competitiva Aviguard e Broilact do que do com o probiótico Biotop, pois em 48 horas foi possível se observar uma grande adesão bacteriana no epitélio com o Aviguard (figura 1) ou com o Broilact em 72 horas (figura 12) do que com o Biotop em 72 horas (figura 21). A colonização bacteriana depende da interação física com o epitélio. Este resultado pode ser consequência das características dos produtos utilizados, uma vez que, produtos de exclusão competitiva se caracterizam por apresentar em sua composição culturas indefinidas de bactérias, ou seja, inúmeros gêneros bacterianos (PIVNICK et al., 1981) que irão se estabelecer sobre o epitélio pela interação com este de maneira diferente (APAJALAHTI et al., 2004). E, os probióticos se caracterizam por serem culturas bacterianas definidas (STAVRIC et al., 1985), dessa forma, estes poucos gêneros bacterianos poderiam competir pelo mesmo sítio de ligação à célula epitelial.

No entanto, verificou-se que após dez dias do tratamento com os produtos de exclusão competitiva ou probiótico ocorreu a aderência de bactérias de forma similar entre estes produtos. Barnes et al. (1972) compararam três produtos de exclusão competitiva e demonstraram que existia menor quantidade de muco e bactérias aderidas após um período de 10 dias.

O estudo morfológico comparativo de células caliciformes revelou que nas aves tratadas com produtos de exclusão competitiva ou probiótico e infectadas com *Salmonella* Enteritidis houve a estimulação destas células pelas bactérias presentes nestes produtos, pois ocorreu a secreção de muco. As células caliciformes das tonsilas cecais de aves do grupo 1 ou controle negativo e de aves do grupo 5 ou controle positivo, não mostraram secreção de muco ou apresentaram em quantidades menores quando comparadas aos demais grupos. Kitagaya, et al. (2003) relataram uma redução na quantidade de muco nos vilos nos tratamentos

com os produtos de exclusão competitiva após quarenta e oito horas do tratamento, observaram também uma quantidade menor de aderência bacteriana aos vilos. Os resultados encontrados neste experimento mostraram uma grande diversidade de bactérias aderidas aos vilos (figura 8).

As aves do grupo 5, infectadas com *Salmonella* Enteritidis mostraram, em 24 horas do tratamento, fissuras no tecido (figura 27), sendo estas sugestivas de lesões provocadas por *Salmonella* spp. ao tecido epitelial. Uma característica importante na infecção por *Salmonella* spp, é a ingestão por via oral, onde a bactéria precisa atravessar a barreira epitelial do intestino para iniciar a doença. A invasão de *Salmonella* spp. pode ocorrer através de microvilosidades ou do complexo de junções intercelulares, existindo degenerações destes e a formação de um vacúolo contendo a bactéria (*Salmonella containing vacuole* – SCV) (Takeuchi, 1967). Este fenômeno induzido por *Salmonella* spp. é reversível e de curta duração, células infectadas são capazes de retornar a sua arquitetura normal após a internalização bacteriana (Takeuchi, 1967). Os resultados encontrados sugerem que ocorreu a invasão de células epiteliais de tonsilas cecais (figura 27) e que estas retornaram a sua morfologia normal, pois em 48 horas da infecção o epitélio do ceco de ave do grupo 5 não apresentava alterações (figura 28).

Os resultados encontrados neste estudo confirmam os dados da literatura com respeito a eficácia de produtos de exclusão competitiva ou probiótico na proteção do epitélio intestinal a *Salmonella* spp. Embora os produtos estudados tenham apresentado um comportamento diferente com relação a sua interação ao epitélio de tonsilas cecais.

6 CONCLUSÃO

- As bactérias presentes nos produtos de exclusão competitiva e no probiótico estudado foram capazes de se aderir ao epitélio de tonsilas cecais.
- Houve a estimulação de células caliciformes pelos produtos de produtos de exclusão competitiva e do probiótico estudado, pois se observou a presença de muco no epitélio de tonsilas cecais.
- As aves que receberam o produto de exclusão competitiva Aviguard apresentaram um maior ganho de peso, ao longo do experimento, quando comparado aos demais produtos estudados.
- *Salmonella* Enteritidis provocou lesões no epitélio de ceco.

REFERENCIAS

ANDRADE, M. A., MESQUITA, A. J; STRINGHINI, J. H; CHAVES, L. S; MATTOS, M. S; OLIVEIRA, A. S. C; MORAES, D. M. C., Excreção de *Salmonella enteritidis* em duas linhagens de frango de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 7575-765, 2007.

ANDREATTI FILHO, R. L; SILVA E. N; RIBEIRO, A . R; KONDO N.; CURI P. R.; Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. **Brazilian Journal Microbiology**, V.31, P.107-112, 2000.

APAJALATHI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v.60, p. 223-232, 2004.

BARROS, M. R.; **Identificação e avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp, isolados do ingluvio e ceco de aves (*Gallus gallus*, Linhares, 1758), em relação ao sorotipo de salmonella.** 2003. p 78 Dissertação de (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista de Botucatu, Botucatu, 2003.

BARNES , E. M.; MEAD, G. C. BARNUM, D. A.; HARRY, E. G. The intestinal flora of chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to anaerobic bacteria. **British Poultry Science**, v.13 , p. 311-326, 1972.

BI YU, HAN-YANG TSEN, PETER WEN-SHYG CHIOU. Caecal culture enhances performance and prevents salmonella infection in broilers. *Journal. Applied. Poultry Rescharche*. V. 8, 195-204, 1999.

BOARD, R.G; FULLER, R.; **Microbiology of the avian Egg**. 1 ed. London: Editora Chapman &Hall, 1994, 181p.

BOLELI, I. C, MAIORKA A .; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI M, FURLAN R.; L, GONZALES, E. (Ed). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funep; 2002. p. 75-96.

DAVIS, G. S.; ANDERSON, K. E. The effects of feeding the direct-fed microbial, primalac, on growth parameters and egg production in single comb white leghorn hens. *Poultry Science*, v. 81, p. 755-759. 2002.

DAY, C. A. **Competitive exclusion in poultry: a review**. Worcessershire: life-care Products, p.18, 1992,

DOBROGSZ, W. J.; BLACK, B. L.; CASAS, I. A. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 70, p. 158, 1991.

DUKE, G.E. Physiology of digestion and metabolism. **Zootecnia Internacional**, New York, v. 17, n. 8, p. 50-53, 1994.

DUKE, E. G. Diteção nas aves. In **Dukes/Fisiologia dos animais domésticos**. Getty. R. editor 5ª ed vol II, Interamericana, p.390-397, 1996.

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

FRANCO, S. G.; REQUE E. F.; LEAL FILHO, J. M.; FEDALTO, L. M.; WARPECHOWSKI, M. B., Avaliação de probióticos desenvolvidos na Universidade Federal do Paraná com Frangos de corte. *Arch. Veterinary. Science*. V. 4, n.1, p. 77-79, 1999.

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

GARRIGA, M.; PASCHUAL, M.; MONFORT, J.; HUGAS, M. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. **Journal. Applied. Microbiology**. V. 84, p. 125-132, 1998.

GAST, R. K. Salmonella infections. In: SAIF, Y. M. **Diseases of poultry**, 11. ed. Iowa: State University Press, 2003. cap.16, p. 567-599.

GAST, R. K.; BENSON, S. T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates and other phage types isolated from poultry in the United States. **Avian Diseases**, v. 39, p. 567-574, 1995.

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

GILL, H.S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best practice & Research**. v.17, p. 775-773, 2003.

HOUDIJK, J. G. M., BOSCH, M. W. TAMMINGA, S.; Apparent ileal and total-tracnutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. **Journal of Animal Science**, v. 77, p 148-158. 1999.

ITO, N. M. K.; MIAJI, C. .I.; LIMA, A, E.; et al. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: **PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**, 2004, Campinas. Anais... Campinas: FACTA. 2004. p 206-260.

ISOLAURI, E.; SALMINEN S., OUWEHAND A. C. Probiotics. Best Pract , **Revista Clinica Gastroenterologia**. V .18, p. 299-313., 2004.

KITAGAWA, H.; HOSOSKAWA, M.; TAKEUCHI, T.; YOKOYAMA T.; IMAGAYA T.; UEHARA, M.; The cellular differentiation of m cells crypt undifferentiated epithelial cells into microvillous epithelial cell in follicle-associated epithelia of chicken cecal tonsils. **Journal.Veterinary. Science** v. 65, n. 2, p. 171-178, 2003.

KLOSE, V.; MOHN, M.; PLAIL, R; SCHATZMAYR G., LOIBNER. A.P ,. Development of a competitive exclusion product for poultry meeting the regulatory requirements for registration in the European Union. *Molecular. Nutrition. Food. Research*, v. 50, p. 563-571, 2006

LIMA, H, J, D, A, Prebióticos na dieta de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n°4, p. 599-606, 2008.

LODDI, M. M.; Probióticos e prebióticos na nutrição de aves., **Revista CFMV**, Brasília, v.7, n. 23, p. 5-11, 2001. Suplemento Técnico.

MACARI, M; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO, DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Anais, Vol.2, Campinas, 2000. p.161-174.

MACARI, M. **Fisiologia do Sistema Digestivo das Aves** (I). Aves e Ovos, v.8, p, 2-20, 1999.

MAI, V. Dietary Modification of the Intestinal Microbiota. **Nutri. Revista**. v. 62, p.235-242, 2004.

MAIORKA A, Fischer da Silva AV, Santin E, Borges AS, Boleli IC, Macari M. Influência da suplementação de Glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52,p. 487-490, 2000a;.

MAIORKA,A.; SANTIN, E.; FISCHER , S, A, V, BRUNO, L, D, G.; BOLELI, I, C.; MACARI,;M. Desenvolvimento do trato gastrointestinal de embriões oriundos de matrizes pesadas de 30 e 60 semanas de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 141-148, 2000b.

MARE, L.; WOLFAARDT G. M.; DICKS L. M. T.;. Adhesion of *Lactobacillus plantarum* 423 and *Lactobacillus salivarius* 241 to the intestinal tract of piglets, as recorded with fluorescent in situ hybridization (FISH), and production of plantaricin 423 by cells colonized to the ileum. **Journal. Applied. Microbiology**. v.100 p. 838-845, 2006.

MEAD, G. C.; BARROW, P. A.; HINTON, M. H.; HUMBERT, F.; IMPEY, C. S.; LAHELLEC, C.; MULDER, R. W. W.; STAVRIC, S.; STERN, N. J. Recommended assay for treatment of chicks to prevent *Salmonella* colonization by competitive exclusion. **Journal of Food Protection** v. 52, n.7, p. 500-502. 1989.

MERCENIER, A., S. PAVAN, and B. POT. **Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects**. Curr Pharm Des. 9(2):175-91. 2003

NOBRE, F. G. A.; GOMES, L. P.; COELHO, S. M. O.; SILVA, I. O.; CEDRO, T. M. M.; SOUZA, M. M. S.; CALIXTO, L. F. L.; CURVELLO, F. A. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota bacteriana isolada do ceco de frangos de corte caipira produzidos em diferentes sistemas de alojamento. **Revista Universidade Rural: Série Ciências da vida, Seropédica, RJ: EDUR**, v. 25, n. 2, p.1-15, 2005.

NOUJAIM, J. C., Detecção de linfócitos T no intestino de frangos de corte, tratados com lactobacillus spp, e desafiados com Salmonella enteritidis, Dissertação de mestrado apresentada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista de Botucatu, p. 143, 2005..

NOY Y, SKLAN D. **Metabolic responses to early nutrition**. Journal Applied Poultry Research; 7: 437-451. 1998.

PATTERSON, J. A., BURKHOLDER K. **Application of prebiotics and probiotics in poultry production**. Poultrin. Sciece, v. 82, p. 627-631, 2003.

PAULINO, M. de L.M, PINHEIRO, D.F. Ingestão e digestão de alimentos, **AGRONOMIA Bases da Fisiologia Animal**, 2006.

PELICANO, E. R.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A, OBA, A, NORKUS, E. A, L KODAWARA, M.; LIMA T, M, A, Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes Probióticos. **Revista Portuguesa de ciências veterinárias**, RPCV, v. 98, n. 547, p. 125-134, 2003.

PIVNICHK, H.; BLANCHFIELD, B.; D'AOUST J, Y.; Prevention of salmonella infection in chicks by treatment with fecal cultures from mature chickens (nurturing cultures), **Journal of food protection**, v. 44, n. 12, p. 909-916, 1981

POPPI, L.B, Avaliação do efeito antagônico de espécies de Lactobacillus sobre Escherichia coli O157:H7 e Listeria Monocytogenes “ IN VITRO”. Dissertação de Mestrado apresentado a Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.

REIG, A.L.C., ANESTO, J.B. Prebióticos y probióticos una relación beneficiosa. **Revista Cubana de Alimentación e nutrición**, v.1, n.16, p. 63-68, 2002.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P. Compararison of experimental competitive exclusion cultures for controlling *Salmonella* colonization in broiler chicks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34. 354-358, 2003.

STAVRIC, S.; GLEESON, T, M.; BLANCHFIELD, B.; PIVNICK, H.; Competitive exclusion of *Salmonella* from newly hatched chicks by mixtures of pure bacterial cultures isolated from fecal and cecal contents of adult birds. **Journal of food Protection**, v.48, n 9, p. 778- 782, 1985.

SERVIN, A. L. COCONNIER M.-H.; Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Pract Res Clinic Gastroenterol** v. 17, p. 741-754, 2003.

TACHEUCHI, A Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. **American Journal Pathology**, v. 50, p. 109-136, 1967.

UNI, Z. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chickens small intestine. **British Poultry Science**, v. 41, p. 410-415, 2000.

UNI, Z., GANOT, S.; SJLAN, D.; Posthach development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p. 75-82, 1990.

VANBELLE, M.; TELLER, E. FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**,v. 40, p. 477-484. 1990.

WALKER, W. A.; DUFF, L. C.. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. **Journal Nutrition Biochemical**, v. 9, p. 668-675, 1998

WATANABE, LI-SEI; OGAWA, KOICHI. **Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução**: ultraestrutura de células e tecidos, 1. ed. Paulo's Comunicação e Artes Gráficas, 2007., p. 11-14.

YAMAUCHI KE, Isshiki Y. Scanning electron microscopic observations on the intestinal villi in growing White Leghorn and broiler chickens from 1 to 30 days of age. **British Poultry Science**;v. 32, p. 67-78, 1991.

APENDICE A

Apêndice A: Composição da ração inicial utilizada na alimentação das aves durante o experimento.

Formula Ração Inicial:

Ingredientes	%
Milho	61400
Farelo de Soja 45,5%	34200
Fosfato Bicálcio 24/18	2000
Calcário fino	0750
Óleo de soja	0,700
Sal comum	0,400
DI Metionina 99%	0,185
Lisina	0,105
Cloreto de colina 60%	0,098
Premix frango de corte	0,120
Garantia	
Proteína min	20,0
Em mínimo	2850,0

Níveis Nutricional Informado pelo Fabricante.