**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Efeitos de níveis de treonina e aditivo fitogênico na ração sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos desafiados com *Eimeria* spp.

Jaqueline Moreira Rafael

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2015**

Jaqueline Moreira Rafael
Zootecnista

Efeitos de níveis de treonina e aditivo fitogênico na ração sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos desafiados com *Eimeria* spp.

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Rafael, Jaqueline Moreira

Efeitos de níveis de treonina e aditivo fitogênico na ração sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos desafiados com *Eimeria* spp. / Jaqueline Moreira Rafael. - - Piracicaba, 2015.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Microbiota 2. Mucina 3. Morfometria intestinal I. Título

CDD 636.513
R136e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

Aos meus queridos e amados pais, Domingos e Edilaine, pelo amor, apoio e confiança incondicional. Aos meus irmãos, Jéssica e Vinicius, pelos conselhos, amor e companheirismo. Acredito que nossa união familiar me mantém forte na luta pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar o meu caminho, sendo fiel e justo. Obrigada meu Deus, por todas as bênçãos alcançadas.

Aos meus pais, Domingos e Edilaine, por serem meu porto seguro, acreditando sempre na minha vitória. Pelo amor e apoio em todos os momentos dessa minha caminhada.

À minha irmã Jéssica, por ser um exemplo, por me inspirar. Você é essencial na minha vida. Ao meu irmão, Vinicius, pelo carinho e companheirismo nesses anos, você é especial.

Ao meu cunhado predileto, José, pela amizade, pelos ensinamentos e pelas conversas sobre nossa caminhada na pós-graduação.

Ao Prof. José Fernando Machado Menten pela dedicação, oportunidade, ensinamentos e orientação nesses anos. O senhor serve de inspiração, sua inteligência e sabedoria são virtudes a serem seguidas.

À Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES e a FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Valdomiro Shigueru Miyada pelos ensinamentos e contribuição durante o curso.

Aos amigos que fiz durante o curso de mestrado, em especial: Cristiano, Dandara, Gláucia, Guilherme, Maicon, Maria, Naiara, Natalia e Rafaela.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia dos Solos da ESALQ, em especial ao Pedro, que foi muito amigo durante esse período.

Ao professor Fernando Andreote pelo apoio e ajuda necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos de Jaboticabal e Ribeirão, que mesmo distantes, foram essenciais no desenvolvimento desse trabalho. Em especial, a minha grande parceira, amiga para todas as horas, Veri, por estar sempre presente, me ajudando e colaborando em todos os momentos.

A todos os professores e pessoas que contribuíram para minha formação passando seus conhecimentos e experiências vividas no decorrer do curso.

A nossa querida secretaria, Sandra, que além de exercer seu cargo na instituição, é amiga, alegria e entusiasmo para os alunos que passam por esse departamento.

Aos funcionários da Avicultura e demais funcionários (Alexandre, Filó, Carlão, Gaucho, Paulinho, Henrique) do setor de não ruminantes da ESALQ pela ajuda na condução dos experimentos.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, obrigada.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amyr Klink

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Os óleos essenciais	21
2.2 Treonina	22
2.3 Efeitos sobre o desempenho.....	23
2.4 Efeitos sobre a morfometria	24
2.5 Efeitos sobre a microbiota	25
2.6 Efeitos sobre a produção de mucina	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Instalações e equipamentos.....	29
3.2 Delineamento e tratamentos experimentais	29
3.3 O desafio experimental.....	31
3.4 Variáveis avaliadas	32
3.4.1 Desempenho	32
3.4.2 Morfologia intestinal.....	32
3.4.3 Microbiota intestinal.....	33
3.4.4 Mucina.....	33
3.5 Procedimentos laboratoriais	33
3.5.1 Histologia.....	33
3.5.2 Microbiota Intestinal.....	34
3.5.2.1 Preparo do pélete bacteriano do conteúdo luminal do intestino delgado	34
3.5.2.2 Preparo do conteúdo luminal do ceco	35
3.5.2.3 Extração do DNA das amostras do conteúdo intestinal.....	35
3.5.2.4 Amplificação e Sequenciamento do 16S rDNA bacteriano.....	36
3.5.3 Mucina.....	37
3.6 Forma de análise dos resultados	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Desempenho	39
4.2 Morfometria	45
4.3 Quantidade de Mucina no conteúdo ileal	50
4.4 Microbiota intestinal.....	51

4.4.1 Análise do índice de riqueza e diversidade (alfa-diversidade)	51
4.4.2 Análise de coordenadas principais (β - diversidade)	52
4.4.3 Sequenciamento – Frequência dos gêneros	56
5 Considerações Finais	61
REFERÊNCIAS	62

RESUMO

Efeitos de níveis de treonina e aditivo fitogênico na ração sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos desafiados com *Eimeria* spp.

O estudo da relação entre os aditivos utilizados e os nutrientes é fundamental para o aprimoramento da utilização desses insumos e o máximo desempenho dos animais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho e saúde intestinal (morfometria, microbiota do intestino e produção de mucina) em frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. alimentados com rações com níveis crescentes de treonina digestível e a inclusão de uma combinação de óleos essenciais. Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 3x2, com três níveis de treonina digestível (100, 110 e 120% das recomendações) e suplementação ou não de óleos essenciais na ração, em um experimento no delineamento inteiramente casualizado. As rações baseadas em milho e farelo de soja foram formuladas para atender as necessidades de todos os nutrientes e fornecidas à vontade. Cada tratamento tinha seis repetições com 45 aves cada, totalizando 1620 animais. Aos 14 dias de idade, todas as aves foram desafiadas com *Eimeria* spp. via oral. O desempenho das aves foi avaliado semanalmente até 40 dias e, aos 21 e 40 dias de idade, foram coletadas amostras dos intestinos para análise de morfometria das vilosidades. Aos 21 dias de idade foram coletadas amostras do conteúdo do intestino delgado e cecos para análise da microbiota. Aos 40 dias, o conteúdo do íleo foi coletado para a determinação da produção de mucina. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5%, avaliando a interação e os efeitos dos fatores principais. Aos 40 dias de idade, a inclusão do blend de óleos essenciais na dieta diminuiu o consumo de ração dos animais, sem alterar o ganho de peso e a conversão alimentar. Aos 21 dias, houve efeito significativo ($p < 0,05$) no nível de 120% de treonina digestível comparado ao nível de 110%, onde os animais que receberam um maior nível de treonina na dieta obtiveram uma maior altura de vilos no íleo. Não houve efeito dos tratamentos sobre a quantidade de mucina no conteúdo ileal de frangos de corte aos 40 dias de idade. A inclusão de níveis crescente de treonina digestível e óleos essenciais na dieta, não modifica a população microbiana, podendo ser observado apenas tendências de alterações nas frequências de alguns gêneros no ceco dos animais.

Palavras chaves: Microbiota; Mucina; Morfometria intestinal

ABSTRACT

Effects of levels of threonine and a phytogenic additive in the diets on the performance and gut health of chickens challenged with *Eimeria* spp.

The study of the relationship between the additives and nutrients is essential for improving the use of these substances and the maximum animal performance. The purpose of this study was to examine the effects of levels of threonine and the inclusion of blends of essential oils on the performance and intestinal health (morphology, intestinal microbiota and mucin production) in broilers challenged with *Eimeria* spp. The treatments followed a 3x2 factorial arrangement with three levels of digestible threonine (100, 110, 120% of the Brazilian Tables recommendations), and supplementation or not of a blend of essential oils in the feed in a completely randomized design experiment. The diets based on corn and soybean meal to meet the nutritional requirements were fed *ad libitum*. Each treatment had six replicates of 45 birds each, totaling 1620 animals. On day 14, all birds were orally gavaged with 10 times the recommended dose of a commercial coccidial vaccine with sporulated live oocysts of *Eimeria* spp. . Performance was evaluated weekly until 40 days of age. At 21 and 40 days of age, samples of the intestines were collected for morphometry. At 21 days of age samples of the contents of the small intestine and the cecum were collected for analysis of microorganisms. At 40 days of age, the contents of the ileum were collected for determining the mucin production. The data were submitted to analysis of variance at 5%, studying the interaction and the effects of the main factors. At 40 days of age the inclusion of essential oils in the diet decrease the feed intake of the animals, without changing growth and feed conversion . At 21 days of age, 120% of digestible threonine in the diet increased the height of villus in the ileum when compared with 110% of digestible threonine ($p < 0,05$). There was no effect of treatments on the production of mucin in the contents of the ileum. The increasing levels of digestible threonine and essential oils in the diet did not modify the microbiota. It is possible to observe a tendency of change on the frequency of some genera in the cecum of the animals.

Keywords: Microbiota; Mucin; Intestinal morphology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aviário Experimental	29
Figura 2 - Inoculação de oocistos esporulados vivos atenuados aos 14 dias de idade	32
Figura 3 - Fragmentos de intestino para análise morfométrica	33
Figura 4 - Altura de vilos (A) e profundidade de criptas (B).....	34
Figura 5 - Coluna para filtragem do conteúdo do intestino delgado	35
Figura 6 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos perfis relativos às comunidades bacterianas do conteúdo do intestino delgado e ceco.....	53
Figura 7 - PcoA do intestino delgado levando em consideração o nível de treonina na dieta	54
Figura 8 - PCoA do ceco levando em consideração a inclusão de treonina na dieta	55
Figura 9 - PCoA do intestino delgado levando em consideração a inclusão de óleo essencial na dieta	55
Figura 10 - PCoA do ceco levando em consideração a inclusão de óleo essencial na dieta	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes, composição percentual e valores nutricionais calculados das rações para frangos de corte nas fases pré-inicial (1-7 dias), inicial (7-21dias), crescimento (21-35dias) e final (35 a 40 dias)	31
Tabela 2 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementados ou não com aditivo de 1 a 7 dias.....	39
Tabela 3 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementados ou não com aditivo de 1 a 14 dias.....	40
Tabela 4 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementados ou não com aditivo de 1 a 21 dias.....	41
Tabela 5 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementados ou não com aditivo de 1 a 28 dias.....	42
Tabela 6 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementados ou não com aditivo de 1 a 35 dias.....	43
Tabela 7 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementados ou não com aditivo de 1 a 40 dias.....	45
Tabela 8 - Valores médios de altura de vilos, profundidade de criptas e relação vilo:cripta do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 21 dias idade	47
Tabela 9 - Desdobramento da interação entre níveis crescentes de treonina digestível e óleos essenciais para a relação vilo:cripta no jejuno aos 21 dias de idade	48
Tabela 10 - Valores médios de altura de vilos (AV), profundidade de criptas (PC) e relação vilo:cripta (V:C) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 40 dias idade	49
Tabela 11 - Quantidade de mucina no conteúdo ileal de frangos de corte aos 40 dias de idade.....	50
Tabela 12 - Índices de riqueza e diversidade bacteriana no conteúdo do intestino delgado.....	51
Tabela 13 - Índices de riqueza e diversidade bacteriana no conteúdo do ceco	52
Tabela 14 - Frequência (%) dos gêneros predominantes no conteúdo do ceco das aves.....	58
Tabela 15 - Frequência (%) dos gêneros predominantes no conteúdo do intestino delgado das aves	59

1 INTRODUÇÃO

O adequado fornecimento dos nutrientes em uma dieta balanceada, o correto manejo sanitário do lote e um ambiente favorável permitem que as aves possam expressar seu máximo potencial genético através de bons índices zootécnicos. No entanto, conseguir manter todas as condições ideais na produção avícola é um obstáculo para o setor.

Dessa maneira, situações de desafio no campo são comuns durante o processo produtivo. Durante um desafio, ocorrem distúrbios na microbiota normal ou mesmo nas células epiteliais intestinais que interferem na capacidade digestiva dos animais, causando queda na produção.

Um dos desafios que mais atinge a produção avícola mundial é a coccidiose. A coccidiose é uma doença causada por diferentes espécies do protozoário *Eimeria*, entre elas a *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix* e *Eimeria tenella* são conhecidas como as de maior causadoras de prejuízos no desempenho dos animais, causando de moderadas a severas lesões em diferentes segmentos do intestino das aves. A indústria avícola tem desenvolvido uma série de aditivos, entre os quais os aditivos fitogênicos, que são utilizados para controlar essas alterações na morfometria e na microbiota intestinal favorecendo o desempenho produtivo das aves.

Os óleos essenciais são aditivos fitogênicos utilizados em substituição ao uso de promotores de crescimento antimicrobianos, com o objetivo de melhorar o desempenho dos animais. O uso desse aditivo nas rações pode influenciar na saúde intestinal do animal, alterando com isso o aproveitamento dos nutrientes e, consequentemente, a resposta do animal.

A treonina é o terceiro aminoácido limitante em rações avícolas sendo crucialmente importante para a manutenção do intestino (RHODES, 1989). Podemos destacar sua participação no funcionamento do trato gastrointestinal, por fazer parte da constituição da mucina e dos anticorpos, moléculas fundamentais para a saúde intestinal dos animais. Grande parte (mais do que 50%) da treonina presente na dieta é retida no intestino de suínos saudáveis (STOLL et al., 1998).

O conhecimento da atuação dos óleos essenciais no organismo animal, bem como sua relação com os nutrientes, é importante para uma adequada utilização dos insumos disponíveis no mercado. Uma nutrição adequada é necessária para que os aditivos fitogênicos possam expressar seu potencial de utilização, auxiliando na

criação de animais que atendam às novas exigências dos consumidores por animais saudáveis, criados com o mínimo impacto ambiental.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos obtidos com o uso de óleos essenciais e níveis crescentes de treonina digestível em dietas avícolas sobre os parâmetros zootécnicos e saúde intestinal dos animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os óleos essenciais

Os óleos essenciais são líquidos oleosos produzidos a partir de diferentes partes das plantas. Podem ser extraídos por fermentação e destilação a vapor d'água, por atividade enzimática seguida de destilação a vapor d'água ou ainda através da extração com o dióxido de carbono líquido sob baixa temperatura e alta pressão (Burt, 2004). Nos últimos anos, vêm sendo utilizados em substituição ao uso de promotores de crescimento antimicrobianos.

Sob o ponto de vista químico, os óleos essenciais são constituídos de inúmeros componentes, sendo os terpenos os metabólicos secundários mais presentes na sua constituição (BAKKALI et al., 2008). Os metabólitos secundários são substâncias produzidas pelo metabolismo das plantas com o objetivo de proteger contra a ação de algum agente externo que represente risco para a sua sobrevivência. Não são substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, tendo sua produção variável de acordo com o ambiente em que está inserida. Dessa maneira, há uma variação na concentração dessas substâncias nas diferentes plantas localizadas em diferentes ambientes.

O composto presente em maior quantidade em um óleo essencial será considerado o seu princípio ativo. Por exemplo, o princípio ativo do orégano é o carvacrol, já que esse composto está presente em 60% do óleo. No entanto, o carvacrol pode ser encontrado também no tomilho, mas o princípio ativo será o timol, por este estar presente em maior quantidade no tomilho (KAMMEL, 2000).

A proibição do uso de antibióticos como melhoradores de desempenho em diversos países foi responsável pelo crescimento acelerado da utilização desses produtos naturais na produção animal. Com isso, surgiu a necessidade de aumentar o desenvolvimento de pesquisas que avaliem o modo de ação dessas substâncias no organismo animal bem como sua potencial capacidade de serem utilizadas como um melhorador de desempenho natural. Os princípios ativos mais estudados para a utilização na alimentação animal são: capsaicina (pimenta), carvacrol (orégano), timol (tomilho), cinamaldeído (canela), eugenol (cravo), cineol (eucalipto), limoneno (limoeiro), mentol (laranja), cúrcuma (alçafrão) e alicina (alho).

Os óleos essenciais atuam melhorando a conversão alimentar (ALP et al., 2012), além de terem função na saúde intestinal, tendo atividade antimicrobiana em aves (MITSCH et al., 2004) e suínos (HENN et al., 2010). Além disso, frangos de corte recebendo dietas suplementadas com óleos essenciais conseguem obter um melhor aproveitamento energético da dieta, possivelmente devido a um menor gasto de manutenção (BRAVO et al., 2011) e uma melhor eficiência metabólica de conversão da energia absorvida da dieta em músculo (BRAVO et al., 2014).

Os princípios vegetais carvacrol, cinamaldeído e capsaicina estimulam a produção de mucina, favorecendo a defesa do organismo através da redução na adesão de microrganismos patogênicos na parede do intestino (JAMROZ et al., 2006). A mucina é uma glicoproteína de alto peso molecular produzida pelas células caliciformes presentes no intestino dos animais. É constituída de esqueletos proteicos (ricos em serina, treonina e prolina) e uma alta concentração de oligossacarídeos (50 a 80%). Os monossacarídeos comumente encontrados nas mucinas são: n- acetilgalactosamina, n- acetilglicosamina, galactose, fucose e ácido siálico (STROUS e DEKKER, 1992; FORSTNER e FORSTNER, 1994). A camada de muco auxilia na proteção contra a aderência de patógenos e a presença de toxinas no intestino. Dessa maneira, funciona como uma barreira para os microrganismos invasores, sendo uma ferramenta importante em situações de desafio.

A utilização de aditivos fitogênicos na dieta de frangos de corte exerce um efeito sobre a imunidade, o metabolismo e a fisiologia do animal através da alteração da expressão de importantes genes associados à resistência desses animais contra possíveis patógenos e ao metabolismo animal. Por exemplo, o uso de 2 mg / kg de ração de oleoresina de capsaicina promoveu a alteração da expressão de 254 genes em frangos de corte, a maioria ligados ao metabolismo de lipídeos (KIM et al., 2010). Por isso, o conhecimento da maneira que esses princípios ativos atuam no organismo é fundamental para um correto uso desses aditivos nas dietas avícolas.

2.2 Treonina

A treonina é o terceiro aminoácido limitante em rações avícolas. A adequada inclusão desse aminoácido nas dietas é importante para garantir o correto funcionamento do trato gastrointestinal, pois possui participação na saúde intestinal, sendo parte da constituição da mucina e dos anticorpos.

Durante um processo inflamatório, a disponibilidade de treonina pode se tornar um fator limitante para a síntese de mucinas, podendo prejudicar a função de barreira intestinal (STAR et al., 2012). A diminuição da produção de mucina pode comprometer a camada de muco no intestino e reduzir a utilização de nutrientes (HORN et al., 2009).

Em frangos de corte na fase inicial, a suplementação de treonina foi mais eficaz nos efeitos sobre a imunidade intestinal, mantendo o crescimento dos animais desafiados com *Eimeria maxima*, do que a utilização de pectina nas dietas (WILSPLOTZ et al., 2013). Este estudo foi indicativo de que em aves desafiadas a exigência de treonina é maior, já que o animal necessita de uma maior quantidade desse nutriente para a manutenção do trato gastrointestinal, pois a síntese de mucina aumenta como resposta ao processo inflamatório (STAR et al., 2012). Como os óleos essenciais podem influenciar a produção de mucina, a exigência de treonina pode ser modificada quando se faz o uso desses aditivos nas dietas.

A maneira que esses aditivos atuarão no organismo modificando o metabolismo dos nutrientes e a saúde intestinal, afetará o desempenho desses animais. Por isso o conhecimento da relação entre os aditivos utilizados nas dietas e os nutrientes é importante apesar de ainda escasso.

2.3 Efeitos sobre o desempenho

Um correto fornecimento de nutrientes na dieta é necessário para que o animal consiga expressar seu máximo potencial genético. Segundo Star et al. (2012), durante uma infecção intestinal a combinação de uma maior exigência de treonina para produção de mucina e a baixa ingestão deste nutriente decorrente do menor consumo de ração poderá fazer da treonina um aminoácido limitante. Com isso, o desempenho das aves não será satisfatório já que para suprir a demanda de aminoácidos no intestino, Reeds e Jahoor (2001) mostraram que a proteína corporal é degradada. Assim, para garantir um desempenho satisfatório, é necessário um adequado fornecimento de treonina na dieta. Em seu trabalho, Star et al. (2012) mostraram que o aumento da relação entre treonina e lisina na dieta favorece o desempenho dos animais desafiados.

Alguns trabalhos realizados com os princípios ativos carvacrol, cinamaldeído e capsaicina não encontraram nenhum efeito positivo sobre o peso corporal de frangos de corte (HERNÁNDEZ et al. 2004; JAMROZ et al., 2005) apesar de uma

melhor conversão alimentar (JAMROZ et al, 2005) e uma melhor digestibilidade dos nutrientes (HERNÁNDEZ et al. 2004) serem relatadas nesses trabalhos. A utilização de *Curcuma longa* em dietas de frangos de corte desafiados com diferentes espécies de *Eimeria* foi eficaz para a obtenção de um melhor ganho de peso corporal dos animais (KIM et al.,2013). Gowda et al. (2009) relataram uma diminuição no consumo de ração quando frangos de corte foram alimentados com dietas contendo 444 ppm de cúrcuma. Por outro lado, Muhl e Libert (2007) não encontraram nenhum efeito sobre o desempenho, o aproveitamento dos nutrientes e a eficiência de utilização da treonina em dietas suplementadas com óleos essenciais (capsaicina, cinamaldeído e carvacrol) fornecidas para frangos de corte na fase de crescimento.

2.4 Efeitos sobre a morfometria

A mucosa gastrointestinal é o primeiro tecido que entra em contato com os constituintes da dieta. A análise microscópica das estruturas do intestino é um bom indicador da resposta do trato gastrointestinal aos aditivos utilizados nas formulações (JAMROZ et al., 2006).

Os processos de absorção de nutrientes dependem dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal e da integridade das estruturas celulares. Manter a integridade da parede do intestino é importante para o processo da digestão e absorção de nutrientes. A integridade da mucosa é afetada quando se tem um quadro inflamatório onde ocorre uma diminuição na proliferação de células nas criptas juntamente com uma descamação no ápice dos vilos, havendo com isso um comprometimento, muitas vezes visível, das estruturas celulares presente no trato gastrointestinal dos animais. Controlar essas alterações é um dos objetivos dos nutricionistas ao formular as dietas fazendo uso de novos e eficazes aditivos presentes na indústria avícola.

Star et al. (2012) concluíram que a inclusão de níveis maiores do que o recomendado de treonina em dietas de frangos de corte desafiados não foi eficaz em evitar lesões no intestino e, apesar de melhorar o peso corporal dos animais desafiados, os mesmos não conseguiram atingir o peso dos animais que não foram desafiados. Por outro lado, Bona et al. (2012) pesquisaram os efeitos de uma mistura de óleos essenciais sobre as lesões no intestino de frangos de corte desafiados com diferentes espécies de *Eimeria* e encontraram efeito positivo da

inclusão desse aditivo na dieta, com uma redução nas lesões causadas pela *Eimeria tenella* e a *Eimeria maxima*. Ainda nesse trabalho, os autores identificaram uma maior altura de vilo e um maior número de células caliciformes no duodeno dos animais alimentados com dietas contendo os óleos essenciais, o que sugere uma melhor capacidade absorptiva desse grupo de animais. No entanto, esses resultados não foram obtidos em outros trabalhos (PERIC et al., 2010; TSIRTSIKOS et al., 2012), em que aditivos fitogênicos não afetaram as vilosidades, criptas e células caliciformes.

Ospina-Rojas et al. (2013) não encontraram efeito significativo na morfologia intestinal e no número de células caliciformes no duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte alimentados com um nível maior de treonina na dieta. A inclusão de óleos essenciais em dietas fornecidas a animais sem um desafio não modificou a morfometria da parede dos cecos de frangos de corte (KARADAS et al., 2014).

A variação nas respostas encontradas pode ser consequência da dieta basal utilizada, dos fatores ambientais ou ainda do nível de inclusão desses insumos nas dietas teste. Por isso é importante a realização de novas pesquisas que evidenciem o real potencial de melhorar a capacidade absorptiva do intestino desses animais através da utilização de óleos essenciais e/ou níveis maiores de inclusão de treonina.

2.5 Efeitos sobre a microbiota

O estudo da população bacteriana presente no trato gastrointestinal de frangos de corte é essencial para o entendimento do funcionamento do organismo animal servindo como uma ferramenta para compreender a maneira que as diferentes espécies de bactérias podem influenciar no desempenho final dos animais. A presença de diferentes espécies de bactérias no intestino pode influenciar negativamente o desempenho dos animais através da competição por nutrientes ou mesmo pela produção de metabólitos.

A presença e a concentração das bactérias nos diferentes segmentos do trato digestório podem ser modificadas através do uso de aditivos fitogênicos. Essas alterações podem ser benéficas para a saúde intestinal, resultando em um melhor desempenho dos animais.

Existe uma complexa interação entre a microbiota e o hospedeiro muito importante para o desenvolvimento do sistema imunológico dos animais. A resposta imune inata, que pode ser representada por α -defensinas e muco, previne que as

bactérias atravessem a barreira da mucosa (HOOPER e GORDON, 2001), servindo como uma barreira e protegendo contra os microorganismos patogênicos.

A microbiota presente no intestino pode ser benéfica para o hospedeiro, servindo como uma barreira contra a colonização por microorganismos patogênicos (VAN DER WAALJ, 1989). No entanto, existem fatores que podem modificar a microbiota presente no organismo. Entre esses fatores, a barreira da mucosa pode atuar impedindo a invasão e aderência das bactérias patogênicas na parede intestinal. Sabe-se que existe uma correlação entre a composição de mucina e a colonização e proliferação bacteriana (TSIRTSIKOS et al., 2012). Jamroz and Kamel (2002) observaram redução significativa no número de *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* em ceco de frangos de corte alimentados com mistura de óleos essenciais de capsaicina, cinamaldeído e carvacrol. Posteriormente, Jamroz et al. (2006), verificaram que a inclusão desses princípios ativos na dieta de frangos de corte estimula a produção de mucina, demonstrando com isso a relação entre o aditivo utilizado e a microbiota intestinal, uma vez que os óleos essenciais afetam a produção de mucina, auxiliando na defesa contra patógenos através da não aderência destes na parede do intestino.

A produção de mucina pode ser influenciada pela disponibilidade de treonina no intestino (FAURE et al., 2007). Nesse sentido, o aumento da treonina digestível poderia estimular a síntese de mucina pelas células caliciformes e reestabelecer a microbiota favorecendo com isso a proteção intestinal (FAURE et al., 2006).

A capsaicina possui um efeito antibacteriano, sendo eficaz contra a *Salmonella* Enteritidis através da alteração no pH e mudanças histológicas (TELLEZ et al., 1993, MCELROY et al., 1994). Por outro lado, a utilização de timol, eugenol, curcumina e piperina na dieta de frangos de corte reduz a população de *Clostridium perfringens* no íleo e no ceco das aves (ABILDGAARD et al., 2010).

O conhecimento da relação entre a fisiologia intestinal e a microbiota é importante para avaliar o impacto da microbiota presente nos indivíduos sobre o desempenho desses animais. Pensando na evolução desse conhecimento, o aprimoramento das técnicas moleculares disponíveis permitiu maior abrangência nos estudos, sendo possível a avaliação de como o perfil da microbiota é alterado de acordo com as diferentes modificações no ambiente, nos alimentos ou mesmo no uso de diferentes aditivos utilizados nas dietas avícolas.

2.6 Efeitos sobre a produção de mucina

A mucina é o principal constituinte da camada de muco no intestino e desempenha um papel fundamental na proteção do intestino da ação de ácidos, enzimas digestivas e microrganismos patógenos (HORN et al., 2009). Ainda segundo esses autores, além das suas funções protetoras, a mucina está envolvida na filtragem de nutrientes no trato gastrointestinal e pode influenciar a digestão e a absorção dos nutrientes. Qualquer componente, alimentar ou ambiental, que induz alterações na produção da mucina tem o potencial para afetar a viscosidade, a integridade da camada de muco e a absorção de nutrientes.

A treonina representa cerca de 30% do total de aminoácidos presentes na mucina (FAURE et al., 2002). Com isso, a capacidade de produção de mucina está relacionada com a disponibilidade desse aminoácido no trato gastrointestinal (PUIMAN et al., 2011), como demonstrado em um experimento em que ratos alimentados com dietas deficientes em treonina tiveram uma diminuição na síntese de mucina (FAURE et al., 2005).

O uso de óleos essenciais na dieta de frangos de corte aumenta a produção de mucina (JAMROZ et al., 2006, TSIRTSIKOS et al., 2012). Por outro lado, a falta de treonina pode reduzir a produção de mucina no intestino (FAURE et al., 2005). Esses fatores apresentados sugerem uma possível relação entre a inclusão de óleos essenciais e treonina na dieta, principalmente em animais desafiados, já que a demanda nutricional é alterada nessa situação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações e equipamentos

O experimento foi realizado nas instalações do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, localizada no município de Piracicaba – SP.

As aves foram alojadas em um aviário experimental (Figura 1), com duas fileiras de 18 boxes cada uma, totalizando 36 boxes. Cada box possui área de 4,5 m² e uma porta de acesso ao corredor. Os boxes são equipados com um bebedouro automático e um comedouro pendular manual, sendo que nos primeiros dias após o alojamento um comedouro e um bebedouro infantis foram utilizados. O aquecimento inicial necessário para manter a temperatura na zona de conforto ideal foi feito fazendo o uso de campânulas a gás.

Figura 1 - Aviário Experimental

3.2 Delineamento e tratamentos experimentais

O período experimental foi de 1 a 40 dias de idade. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e 1620 aves, machos da linhagem Ross AP95[®], foram distribuídas nos seis tratamentos e seis repetições, definindo as parcelas experimentais com 45 animais cada. No início do ensaio as aves foram pesadas individualmente de maneira a constituir as parcelas com pesos homogêneos, conforme descrito por Sakomura e Rostagno (2007).

As rações fareladas foram fornecidas à vontade e formuladas à base de milho e farelo de soja, sem a adição de promotor de crescimento, atendendo as recomendações de Rostagno et al. (2011) para frangos de corte machos de

desempenho superior, exceto para o aminoácido teste, a treonina, dividindo em quatro fases de criação: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (7 a 21 dias), crescimento (21 a 35 dias) e final (35 a 40 dias) (Tabela 1). Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 3x2, com três níveis de treonina digestível (100, 110 e 120% da recomendação) e 0 ou 100 mg/kg de combinação de óleos essenciais (4% de cúrcuma e 4% oleoresina de capsaicina), sendo eles:

T1 - 100% da recomendação de treonina digestível;

T2- 110% da recomendação de treonina digestível;

T3 - 120% da recomendação de treonina digestível;

T4 - 100% da recomendação de treonina digestível + Blend dos óleos essenciais;

T5 - 110% da recomendação de treonina digestível + Blend dos óleos essenciais;

T6 - 120% da recomendação de treonina digestível + Blend dos óleos essenciais.

Assim, os níveis de inclusão de treonina digestível nos tratamentos foram 0,861, 0,947 e 1,033% na fase pré-inicial, 0,791, 0,870 e 0,949% na fase inicial, 0,735, 0,808 e 0,882% na fase de crescimento e 0,689, 0,758 e 0,827% na fase final. Portanto, a relação entre a treonina e a lisina foi de 0,650 nos tratamentos 1 e 4, 0,715 nos tratamentos 2 e 5 e 0,780 nos tratamentos 3 e 6. A adição de treonina correspondente aos dois níveis mais altos de inclusão foi feita em substituição a um inerte (caulim).

O aditivo fitogênico utilizado no experimento foi um produto comercial composto por óleos essenciais sintéticos de cúrcuma e oleoresina de capsaicina. Os extratos vegetais compõem o produto comercial nas seguintes quantidades: 4% de cúrcuma e 4% de oleoresina de capsaicina.

Tabela 1 - Ingredientes, composição percentual e valores nutricionais calculados das rações para frangos de corte nas fases pré-inicial (1-7 dias), inicial (7-21 dias), crescimento (21-35 dias) e final (35 a 40 dias)

INGREDIENTES (%)	Pré-Inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho	51,748	54,980	57,899	61,425
Farelo de Soja	40,732	37,245	33,788	30,639
Óleo de Soja	2,968	3,695	4,617	4,656
Fosfato Bicálcico	1,888	1,546	1,324	1,107
Calcário	0,913	0,945	0,889	0,795
Sal Comum	0,508	0,483	0,458	0,445
DL-Metionina	0,346	0,297	0,276	0,248
L- Lisina HCL	0,278	0,241	0,232	0,229
L-Treonina	0,112	0,086	0,076	0,070
L-Valina	0,047	0,021	0,023	0,016
Inerte (caulim)	0,200	0,200	0,200	0,200
Premix Vitamínico ¹	0,150	0,150	0,120	0,080
Premix Mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050
Cloreto de Colina (70%)	0,060	0,060	0,050	0,040
Óleo essencial	0,000	0,000	0,000	0,000
Total	100	100	100	100
Composição Nutricional Calculada				
Proteína Bruta (%)	23,600	22,173	20,787	19,600
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2960	3050	3150	3200
Cálcio (%)	0,920	0,841	0,758	0,663
Cloro (%)	0,354	0,339	0,324	0,317
Fósforo Disponível (%)	0,470	0,401	0,354	0,309
Potássio (%)	0,896	0,841	0,786	0,739
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195
Arginina Digestível (%)	1,409	1,315	1,221	1,138
Isoleucina Digestível (%)	0,897	0,840	0,783	0,734
Lisina Digestível (%)	1,324	1,217	1,131	1,060
Metionina Digestível (%)	0,644	0,581	0,546	0,505
Met.+ Cistina Digestível (%)	0,953	0,876	0,826	0,774
Valina Digestível (%)	1,020	0,937	0,882	0,827
Treonina Digestível (%)	0,861	0,791	0,735	0,689
Glicina + Serina Total (%)	2,174	2,040	1,906	1,790

¹DSM Nutritional Products, Composição por kg de produto: Vit. A – 9000000 UI; Vit. D3 - 2500000 UI; Vit. E - 20000 UI; Vit. K3 – 2500 mg; Vit. B1 – 2000 mg; Vit. B2 – 6000 mg; Vit. B6–3000 mg; Vit. B12 – 15000mg; Ácido Nicotínico - 35 g; Ácido Pantotênico – 12 g; Biotina–100 mg; Ácido Fólico–1500 mg; Selênio – 250 mg.

²DSM Nutritional Products, Composição por kg de produto: Manganês - 160000 mg; Ferro - 100000 mg; Zinco - 100000 mg; Cobre - 20000 mg; Cobalto - 2000 mg; Iodo - 2000 mg.

3.3 O desafio experimental

Aos 14 dias de idade, todas as aves foram oralmente desafiadas com oocistos esporulados vivos atenuados utilizando 10 vezes a dosagem recomendada por ave de uma vacina comercial para coccidiose (Bio-Coccivet R), conforme Figura 2. A

vacina comercial é constituída de uma suspensão viável das seguintes *Eimerias*: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella* e *E. mitis*.

Figura 2 - Inoculação de oocistos esporulados vivos atenuados aos 14 dias de idade

3.4 Variáveis avaliadas

3.4.1 Desempenho

As variáveis de desempenho (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar) foram avaliadas semanalmente nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 40 de idade, através da pesagem das aves, da ração fornecida e da sobra. A mortalidade foi verificada diariamente.

3.4.2 Morfologia intestinal

Aos 21 e 40 dias de idade, duas aves de cada uma das unidades experimentais, com peso corporal próximo da média, foram sacrificadas por deslocamento cervical e o trato gastrointestinal foi exposto. Foram coletados fragmentos de aproximadamente três centímetros da porção média do duodeno, jejuno e íleo, os quais foram dissecados, abertos longitudinalmente, estendidos e fixados com alfinetes em isopor, lavados abundantemente e cuidadosamente com solução tampão fosfato (PBS pH 7,4) e fixados em formaldeído 10% tamponado (pH 7,4) durante 48 horas (Figura 3).

Figura 3 - Fragmentos de intestino para análise morfométrica

3.4.3 Microbiota intestinal

Para a análise da microbiota intestinal, aos 21 dias de idade, três aves de quatro repetições foram sacrificadas por deslocamento cervical. O intestino delgado e o ceco foram imediatamente congelados. Em laboratório, o conteúdo luminal do intestino delgado e do ceco foi retirado, formando “pools” de cada repetição, totalizando quatro amostras por tratamento de cada compartimento (intestino delgado e ceco), as quais foram armazenadas a -20 °C para a análise da microbiota intestinal.

3.4.4 Mucina

Aos 40 dias de idade, duas aves por repetição foram sacrificadas por deslocamento cervical, para a retirada do conteúdo ileal, formando “pools” de cada repetição, totalizando seis amostras por tratamento, as quais foram armazenadas a -80°C para a determinação da quantidade de mucina no conteúdo ileal.

3.5 Procedimentos laboratoriais

3.5.1 Histologia

Os segmentos de duodeno, jejuno e íleo, divididos longitudinalmente, foram preparados para microscopia de luz convencional com a coloração pelo ácido periódico- Schiff (PAS) (TORRES, 2010). Foram feitos três cortes semi-seriados com cinco micrômetros (μm) de espessura de cada amostra, os quais foram analisados por imagem digitalizada a partir de um microscópio de luz. Foram mensuradas 15

medidas de altura dos vilos e 15 de profundidade das criptas de cada amostra em um aumento de 40X (Figura 4).

Figura 4 - Altura de vilos (A) e profundidade de criptas (B)

3.5.2 Microbiota Intestinal

3.5.2.1 Preparo do pélete bacteriano do conteúdo luminal do intestino delgado

Para a análise da microbiota do conteúdo do intestino delgado foi necessário inicialmente concentrar a fração bacteriana das amostras, de acordo com metodologia (adaptada) proposta por Apajalahti et al. (1998). O protocolo utilizado foi: em uma seringa estéril de 60 mL, sem o êmbolo, foi construída uma coluna para filtração, composta de papel filtro qualitativo número 1 na parte inferior, algodão estéril na porção intermediária e duas camadas de gaze na porção superior (Figura 5). Essa coluna foi colocada em uma garrafa autoclavada de 100 mL apropriada para uma centrífuga refrigerada. Posteriormente, 15 g de conteúdo do intestino delgado, previamente homogeneizado, foram diluídos em 50 mL de SPB 50 mM (buffer de fosfato de sódio pH 8), contendo 0,1% de Tween 80. A mistura foi vagarosamente homogeneizada e adicionada na coluna para filtração. A garrafa contendo a coluna com a amostra foi centrifugada a 4500 rpm por 20 minutos, a 4 °C. Esta coluna funcionou como um filtro, onde ficaram retidas as impurezas da amostra, como ração não digerida. O conteúdo foi filtrado e as bactérias

concentraram-se no fundo da garrafa, na forma de pélete. O líquido remanescente foi então cuidadosamente descartado e o pélete ressuspensionado em 1 mL de solução salina estéril (solução NaCl 0,9%). Esta solução foi distribuída em eppendorfs de 1,5 mL, no volume máximo de 200 μ L por tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7500 rpm por 10 minutos. Novamente o pélete bacteriano precipitou no fundo do tubo e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. O pélete bacteriano restante foi pesado e ressuspensionado em Solução Peptone (1% peptone, 15% de glicerol em água) em proporção 1:10. Essa suspensão foi homogeneizada até não restar mais pélete visível e o líquido ficar turvo e então foi congelada a -20 °C para posterior extração do DNA. Este processo foi realizado no laboratório de Genética da ESALQ.

Figura 5 - Coluna para filtragem do conteúdo do intestino delgado

3.5.2.2 Preparo do conteúdo luminal do ceco

O conteúdo cecal, que possui uma maior concentração de micro-organismos, foi apenas diluído em Solução Peptone na proporção de 1:10.

3.5.2.3 Extração do DNA das amostras do conteúdo intestinal

As análises moleculares foram realizadas no Departamento de Ciência dos Solos, no Laboratório de Microbiologia Molecular. A metodologia utilizada para a extração do DNA bacteriano foi baseada em Lu et al. (2003). As amostras

previamente processadas foram descongeladas e homogeneizadas em vortex. Foram pipetados 500 µL da suspensão e colocou-se em um novo eppendorf, o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado, ficando o pélete bacteriano aderido no fundo do eppendorf. Para a lise mecânica das células bacterianas, o pélete foi diluído em 250 µL da solução do “bead” (Kit Mo Bio Ultra Clean Soil DNA isolation). Em seguida, foram adicionados nos tubos 60 µL da solução S1 e 200 µL da solução IRS (kit Mo Bio Ultra Clean Soil DNA isolation). A mistura foi agitada em vortex por 40 minutos. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 100 rpm por 30 segundos. O líquido foi então transferido para outro eppendorf, no qual foram adicionados 25 µL da solução SDS (10%) e 2,5 µL de proteinase K (segunda lise através da quebra enzimática). A solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos e em seguida novamente centrifugada, sendo que o precipitado foi descartado. As amostras foram tratadas duas vezes com volume idêntico de fenol-clorofórmio-isoamil álcool (25:24:1) e uma vez com clorofórmio-isoamil-álcool (24:1). Após cada tratamento, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. Ao final do último tratamento, adicionaram-se 8 µL de RNase (Roche-RNase –DNA free) e a solução foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Ao final da incubação, a solução contendo o DNA foi lavada com 250 µL de isopropanol, centrifugada e o sobrenadante descartado. O DNA total que se concentrou no fundo do eppendorf foi lavado duas vezes com álcool etílico 70 e 100%, respectivamente. Ao final do processo, o DNA do pool do intestino delgado foi ressuspensionado em 20 µL de água molecular e o DNA do conteúdo cecal foi ressuspensionado em 50 µL de água molecular (Nuclease Free Water). O DNA foi armazenado por uma noite a 4 °C para hidratar e posteriormente congelado a -20 °C. O resultado das extrações foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido glacial, 1 mM EDTA), sendo aplicados 5 µL do produto de DNA extraído e posteriormente corado em solução de brometo de etídeo.

3.5.2.4 Amplificação e Sequenciamento do 16S rDNA bacteriano

O DNA previamente extraído foi amplificado via PCR na região V3 e V4 do gene 16S rDNA depois da desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos, de desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 57° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos. A extensão final foi conduzida por 72° C por 5 minutos. Os primers bacterianos utilizados foram: Forward Primer 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG e Reverse: 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. Além disso, para fazer a primeira PCR utilizou-se 10X PCR Buffer; Cloreto de Magnésio (MgCl_2 – 50mM); dNTP's (10mM) e a Taq Polimerase na concentração de 5U/ μL . Após este primeiro PCR, o produto da reação foi purificado com beads Agencourt AMPureXP, de acordo com instruções do Illumina. Este processo permite a purificação rápida e eficiente do DNA genômico, a partir de uma variedade de amostras, incluindo amostras degradadas. A segunda PCR, com os adaptadores, foi realizada na seguinte condição: 95 °C por 3 minutos, seguindo 12 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, seguido de uma extensão de 72°C por 5 minutos. O produto foi mantido a -20° C até o momento do sequenciamento. Nesta última reação (segunda PCR) foi usado 5 μL de cada adaptador (2 adaptadores para cada amostra), mais 5 μL do produto da primeira PCR, 25 μL do Kit KAPA Biosystem e 10 μL de água, obtendo-se um volume final de 50 μL . Após a segunda PCR, normalizou todas as bibliotecas para uma mesma concentração (6 nanogramas para o ceco e 10 nanogramas para o intestino delgado). Após esse procedimento, utilizou-se 4 μL de cada biblioteca normalizada para se fazer um pool, que foi quantificado em tempo real para a determinação da real concentração da biblioteca. O sequenciamento foi realizado no MiSeq, com o “Kit MiSeq Reagent kit v2 (500 ciclos)”. O produto foi analisado pelo software MiSeq Reporter, na opção Metagenomics, do próprio Illumina para se obter o sequenciamento das amostras.

3.5.3 Mucina

A quantidade de mucina no conteúdo ileal foi determinada de acordo com o método descrito por Lien et al. (1997) e modificado por Horn et al. (2009) . Todo o conteúdo ileal coletado (uma média de 52 g/ por amostra) foi colocado em uma placa de Petri e congelado a -80 °C até ser liofilizado a – 40 °C e pressão de vácuo de 0,120 mbar por 48 horas. Posteriormente, um total de 3g do conteúdo ileal liofilizado foi colocado em um tubo plástico de 50 mL com 20 mL da solução gelada 0,15 M NaCl (0,15 M NaCl e 0,02 M NaNH_3 , mantida a 4 °C) e homogeneizada por 30 segundos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C. O solúvel sobrenadante foi decantado em um tubo de 50 mL previamente pesado. Foram adicionados 15 mL de etanol absoluto gelado (4 °C) para a extração da

proteína mucina. A mistura foi extraída durante a noite a -20 °C e centrifugada a 1400 x g por 10 minutos a 4 °C para se obter o grânulo de mucina. Em seguida, 10 mL da solução gelada NaCl (0,15 M NaCl e 0,02 M NaNH₃, 4 °C) e 15 mL de etanol absoluto gelado foram adicionados para lavar o sedimento de mucina. Novamente a amostra foi extraída durante a noite a -20 °C e, em seguida, centrifugada a 1400 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento de mucina foi consecutivamente lavado até obter um sobrenadante claro. Finalmente, o sobrenadante claro foi removido por aspiração e o sedimento resultante foi pesado para determinar a quantidade de mucina bruta no conteúdo ileal.

3.6 Forma de análise dos resultados

Os dados referentes ao desempenho, morfometria intestinal, mucina e microbiota intestinal foram analisados quanto à normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias e então submetidos à análise de variância a 5%, utilizando o procedimento GLM do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS 9.3), avaliando a interação e os efeitos dos fatores principais.

Os índices de riqueza e diversidade (índice de Shannon Weaver) foram calculados com os resultados do sequenciamento através do programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*), utilizando o comando (alpha_diversity.py).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho

No período de 1 a 7 dias, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) no consumo de ração quando o aditivo fitogênico estava presente nas dietas (Tabela 2). Este resultado é semelhante ao encontrado por Gowda et al. (2009) que encontraram uma redução no consumo de ração de frangos de corte suplementados com 444 ppm de cúrcuma. No entanto, para as outras variáveis analisadas não houve efeito significativo de tratamentos.

Tabela 2 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementadas ou não com aditivo de 1 a 7 dias

Tratamentos		PV ¹ (g)	GP ² (g)	CR ³ (g)	CA ⁴
100% TRE ⁵		151	107	125	1,170
110% TRE		147	103	122	1,192
120% TRE		150	106	124	1,170
100% TRE + OE ⁶		141	98	118	1,207
110% TRE + OE		144	100	118	1,182
120% TRE + OE		150	106	121	1,150
CV		4,95	6,96	4,71	4,02
ANOVA					
TRE		0,2691	0,2773	0,5527	0,2703
OE		0,0764	0,0959	0,0134	0,8969
TRExOE		0,2600	0,3016	0,5755	0,3096
TRE	100	146	102	121	1,188
	110	145	101	120	1,186
	120	150	106	122	1,160
OE	Sem	149	105	124a	1,177
	Com	145	101	119b	1,179

¹ Peso Vivo; ² Ganho de Peso; ³ Consumo de Ração; ⁴ Conversão Alimentar; ⁵ Treonina; ⁶ Óleos Essenciais.

No período de 1 a 14 dias, a inclusão de 120% de treonina nas dietas aumentou o consumo de ração pelos animais quando comparado aos animais que recebiam 110% de treonina digestível. Além disso, a suplementação de óleos essenciais na dieta diminuiu o ganho de peso dos animais. Esta redução pode ser atribuída ao menor consumo de ração no período, uma vez que a conversão alimentar com ou sem óleos essenciais foi praticamente idêntica (Tabela 3). Esses resultados diferem dos encontrados por Murakami et al. (2014), em que o uso de óleos essenciais em dietas para frangos de corte antes dos animais serem

desafiados foi eficiente, possibilitando um melhor ganho de peso e uma melhor conversão alimentar dos animais. Lee et al. (2013), suplementando a dieta de frangos de corte com capsaicina e cúrcuma não encontraram nenhum efeito significativo sobre o ganho de peso e consumo de ração de 1 a 14 dias de idade.

Tabela 3 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementadas ou não com aditivo de 1 a 14 dias

Tratamentos		PV ¹ (g)	GP ² (g)	CR ³ (g)	CA ⁴
100% TRE ⁵		447	403	541	1,342
110% TRE		446	401	532	1,327
120% TRE		447	404	545	1,353
100% TRE + OE ⁶		431	387	521	1,349
110% TRE + OE		433	389	520	1,336
120% TRE +OE		448	404	540	1,338
CV		3,03	3,37	3,11	2,62
ANOVA					
TRE		0,1442	0,1253	0,0201	0,5708
OE		0,0272	0,0306	0,0141	0,9749
TRExOE		0,1779	0,2047	0,4673	0,6757
TRE	100	439	395	531ab	1,345
	110	439	395	526b	1,331
	120	447	404	543a	1,345
OE	Sem	447a	403 ^a	540a	1,340
	Com	437b	393b	527b	1,341

¹ Peso Vivo; ² Ganho de Peso; ³ Consumo de Ração; ⁴ Conversão Alimentar; ⁵ Treonina; ⁶ Óleos Essenciais.

No período de 1 a 21 dias, houve efeito da inclusão de treonina digestível para as variáveis consumo de ração e conversão alimentar (Tabela 4). O maior nível de treonina digestível (120%) proporcionou o maior consumo de ração sem afetar o ganho de peso dos animais. Consequentemente, uma pior conversão alimentar foi observada nesse tratamento. Não houve efeito significativo da inclusão do aditivo fitogênico nas dietas experimentais sobre o desempenho das aves. Esses resultados diferem dos encontrados por Kim et al., (2013) que utilizando cúrcuma na dieta de frangos de corte desafiados com diferentes espécies de *Eimeria* obtiveram um melhor peso corporal dos animais quando comparado aos animais que não receberam o aditivo fitogênico na dieta após o desafio. Além disso, Bravo et al., (2014) utilizando um blend com capsaicina, carvacrol e cinamaldeído de 1 a 21 dias de idade na dieta de frangos de corte demonstraram um maior ganho de peso diário

dos animais bem como uma melhor eficiência alimentar, devido a uma melhor digestibilidade da gordura. Lee et al. (2013), suplementando a dieta com cúrcuma e capsaicina relataram maior ganho de peso dos animais após o desafio com *Eimeria maxima* e *Clostridium perfringens* quando comparado aos animais que não receberam o aditivo na dieta nesse mesmo período.

Tabela 4 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementadas ou não com aditivo de 1 a 21 dias

Tratamentos		PV ¹ (g)	GP ² (g)	CR ³ (g)	CA ⁴
100% TRE ⁵		856	806	1160	1,440
110% TRE		832	783	1141	1,456
120% TRE		842	795	1170	1,472
100% TRE + OE ⁶		823	774	1120	1,448
110% TRE + OE		824	774	1128	1,457
120% TRE +OE		854	806	1174	1,476
CV		3,02	3,17	2,93	1,67
ANOVA					
TRE		0,1235	0,0815	0,0070	0,0119
OE		0,2151	0,1944	0,0913	0,6149
TRExOE		0,0728	0,0873	0,1835	0,9223
TRE	100	840	790	1140b	1,444b
	110	828	779	1135b	1,457ab
	120	848	800	1172a	1,474a
OE	Sem	843	795	1157	1,456
	Com	834	785	1141	1,460

¹ Peso Vivo; ² Ganho de Peso; ³ Consumo de Ração; ⁴ Conversão Alimentar; ⁵ Treonina; ⁶ Óleos Essenciais.

De 1 a 28 dias, houve efeito significativo ($p < 0,05$) para as variáveis ganho de peso e consumo de ração (Tabela 5). O nível de 120% de treonina digestível na dieta proporcionou um maior consumo de ração pelos animais, além de um melhor ganho de peso quando comparado ao nível de 110% de treonina disgestível. A presença de óleos essenciais nas dietas experimentais diminuiu o consumo de ração pelos animais sem comprometer o ganho de peso. Lee et al.(2003), suplementando a dieta de frangos de corte fêmeas no período de 1 a 28 dias com 200 ppm de carvacrol também encontraram um menor consumo de ração pelos animais, além de um menor ganho de peso. Durrani et al. (2006) relataram que ao suplementar 0,5% de cúrcuma na dieta de frangos de corte obtiveram um melhor ganho de peso

e conversão alimentar dos animais com uma redução significativa no consumo de ração comparado ao grupo controle.

Tabela 5 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementadas ou não com aditivo de 1 a 28 dias

Tratamentos		PV ¹ (g)	GP ² (g)	CR ³ (g)	CA ⁴
100% TRE ⁵		1589	1539	2251	1,462
110% TRE		1556	1507	2214	1,468
120% TRE		1574	1528	2259	1,479
100% TRE + OE ⁶		1537	1489	2168	1,457
110% TRE + OE		1543	1493	2182	1,462
120% TRE +OE		1590	1543	2265	1,469
CV		2,42	2.47	2.70	1.46
ANOVA					
TRE		0,0776	0,0484	0,0084	0,2873
OE		0,1644	0,1465	0,0388	0,3149
TRExOE		0,0679	0,0669	0,1118	0,9623
TRE	100	1563	1514ab	2210b	1,460
	110	1549	1500b	2198b	1,465
	120	1582	1535a	2262a	1,474
OE	Sem	1573	1525	2241 ^a	1,470
	Com	1557	1508	2205b	1,462

¹ Peso Vivo; ² Ganho de Peso; ³ Consumo de Ração; ⁴ Conversão Alimentar; ⁵ Treonina; ⁶ Óleos Essenciais.

No período de 1 a 35 dias, os animais alimentados com 120% da recomendação de treonina digestível tiveram um maior consumo de ração do que os que receberam 110% da recomendação (Tabela 6). Além disso, a inclusão de aditivo fitogênico nesse período diminui o consumo de ração pelos animais, sem afetar o ganho de peso dos animais, seguindo o mesmo padrão encontrado de 1 a 28 dias de idade.

Tabela 6 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementadas ou não com aditivo de 1 a 35 dias

Tratamentos		PV ¹ (g)	GP ² (g)	CR ³ (g)	CA ⁴
100% TRE ⁵		2393	2344	3643	1,554
110% TRE		2387	2339	3603	1,541
120% TRE		2403	2356	3660	1,554
100% TRE + OE ⁶		2344	2295	3527	1,537
110% TRE + OE		2368	2318	3550	1,532
120% TRE +OE		2418	2371	3656	1,542
CV		2,38	2,44	2,43	1,43
ANOVA					
TRE		0,1644	0,1381	0,0251	0,4020
OE		0,3425	0,3351	0,0301	0,0961
TRExOE		0,3702	0,3860	0,2120	0,8900
TRE	100	2368	2320	3585ab	1,546
	110	2377	2328	3577b	1,536
	120	2410	2364	3658a	1,548
OE	Sem	2394	2346	3635a	1,550
	Com	2377	2328	3578b	1,537

¹ Peso Vivo; ² Ganho de Peso; ³ Consumo de Ração; ⁴ Conversão Alimentar; ⁵ Treonina; ⁶ Óleos Essenciais.

No período total de criação (1 a 40 dias), houve efeito significativo ($p < 0,05$) para as variáveis consumo de ração e conversão alimentar (Tabela 7). Um maior consumo de ração foi observado nos animais que receberam 120% da recomendação de treonina digestível quando comparado aos animais que receberam 100% da recomendação. Segundo Francesh e Brufau (2004), quando ocorre um desbalanço de aminoácidos na dieta, o excesso desse aminoácido será catabolizado e excretado via rins na forma de ácido úrico, o que poderia gerar um aumento no consumo de água pelos animais. O custo metabólico para incorporar um aminoácido em uma cadeia proteica é de 4 moles de ATP, e para eliminar, 6 moles de ATP/g de nitrogênio (Mc LEOD, 1997). Isso quer dizer, que o catabolismo do excesso de aminoácidos na dieta é oneroso para o sistema, podendo prejudicar o desempenho dos animais. Possivelmente, o excesso de treonina na dieta piorou a conversão alimentar em decorrência do alto custo metabólico para eliminar via ácido úrico o excesso desse aminoácido.

O nível de 120% de treonina digestível acarretou em uma pior conversão alimentar quando comparado aos animais que receberam 110% de treonina digestível. Dessa maneira, foi possível concluir que suplementar a dieta basal com

níveis maiores de treonina digestível não melhora o desempenho zootécnico dos animais, podendo aumentar o consumo de ração desses animais, sem um reflexo positivo no ganho de peso dos mesmos.

A presença de óleos essenciais na dieta diminuiu o consumo de ração, sem afetar o ganho de peso dos animais. Esse resultado é semelhante ao encontrado em diversos trabalhos realizados com o uso de aditivos fitogênicos, onde os pesquisadores relatam um menor consumo de ração dos animais que receberam esses aditivos em sua dieta quando comparado aos animais que não receberam, sem que haja uma alteração no peso final dos animais (BASMACIOGLU et al., 2004; LEE et al., 2003; CABUK et al., 2006). Esse efeito é benéfico, pois a redução no consumo de ração pode proporcionar um aumento na rentabilidade do produtor que terá a possibilidade de reduzir seus custos com a alimentação sem afetar o ganho de peso dos animais. Além disso, trabalhos anteriores demonstram que a inclusão de aditivos fitogênicos nas rações pode influenciar positivamente na digestibilidade de matéria seca e proteína bruta (GARCIA et al., 2007; HERNANDEZ et al., 2004), sendo que a capsaicina pode ser o princípio ativo responsável por esse benefício de melhor aproveitamento proteico da dieta por estimular a ação enzimática das proteases, principalmente a tripsina e a quimotripsina (PLATEL e SRINIVASAN, 1996). Dessa maneira, conclui-se que não é necessária a inclusão de uma maior quantidade de treonina digestível na dieta quando se faz o uso desse aditivo fitogênico, uma vez que este foi eficiente em manter o ganho de peso dos animais.

Tabela 7 - Desempenho de frangos de corte machos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina suplementadas ou não com aditivo de 1 a 40 dias

Tratamentos	PV ¹ (g)	GP ² (g)	CR ³ (g)	CA ⁴	VB ⁵ (%)	
100% TRE ⁶	3002	2952	4785	1,621	98,2	
110% TRE	3023	2975	4775	1,605	99,6	
120% TRE	3016	2970	4839	1,630	99,6	
100% TRE + OE ⁷	2955	2907	4664	1,605	99,3	
110% TRE + OE	2977	2927	4688	1,602	99,6	
120% TRE +OE	3028	2977	4815	1,617	97,0	
CV	2,12	2,16	2,32	1,25	1,97	
ANOVA	VALOR DE P					
TRE	0,2445	0,2395	0,0238	0,0473	0,2120	
OE	0,2052	0,1785	0,0219	0,1016	0,4138	
TRExOE	0,4325	0,4868	0,4718	0,6963	0,0504	
Fatores Principais						
TRE	100	2978	2929	4724b	1,613ab	98,7
	110	3000	2951	4731ab	1,604b	99,6
	120	3022	2974	4827a	1,624a	98,3
OE	Sem	3014	2966	4800a	1.619	99,1
	Com	2987	2937	4722b	1,608	98,6

¹ Peso Vivo; ² Ganho de Peso; ³ Consumo de Ração; ⁴ Conversão Alimentar; ⁵ Viabilidade; ⁶ Treonina; ⁷ Óleos Essenciais.

4.2 Morfometria

Os resultados dos valores médios encontrados da altura de vilos, profundidade de cripta e a relação vilo;cripta aos 21 e 40 dias de idade estão apresentados nas Tabelas 8 e 10, respectivamente. Aos 21 dias, houve efeito significativo ($p < 0,05$) do nível de 120% de treonina digestível comparado ao nível de 110%, sendo que os animais que receberam um maior nível de treonina na dieta tiveram uma maior altura de vilos no íleo. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Xie et al. (2014), trabalhando com patos de 1 a 21 dias, os quais concluíram que os animais que receberam uma maior inclusão de treonina na dieta tiveram maior altura de vilo no duodeno, jejuno e íleo. A inclusão de óleos essenciais nas dietas experimentais não alterou as características morfométricas do intestino ($p > 0,05$). Bona et al. (2012) encontraram maior altura de vilo no duodeno e íleo de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis suplementados com um composto vegetal quando comparado ao grupo controle. Além disso, foi possível observar uma interação dos fatores nível de treonina e óleo essencial na relação vilo:cripta no jejuno (Tabela 9). A relação vilo:cripta diminui com o aumento do nível de treonina digestível da dieta

na ausência dos óleos essenciais. Em contrapartida, com a presença de óleos essenciais na dieta não foi possível observar a mesma tendência.

Tabela 8 - Valores médios de altura de vilos, profundidade de criptas e relação vilo:cripta do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 21 dias idade

Tratamentos		Altura de Vilos (µm)			Profundidade de Cripta (µm)			Vilo:Cripta		
		Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
100% TRE ¹		1463	559	554	384	274	238	3,85	2,09	2,37
110% TRE		1494	553	530	411	299	265	3,68	1,86	2,02
120% TRE		1467	516	580	389	298	267	3,80	1,74	2,12
100% TRE + OE ²		1454	495	556	388	306	277	3,80	1,62	2,02
110% TRE + OE		1384	478	493	378	318	261	3,67	1,55	1,90
120% TRE +OE		1504	573	556	402	289	265	3,78	2,01	2,11
CV		6,76	16,86	9,22	10,20	11,88	11,18	11,67	21,76	17,74
ANOVA		VALOR DE P								
TRE		0,51	0,72	0,02	0,84	0,40	0,78	0,71	0,46	0,28
OE		0,41	0,37	0,22	0,72	0,24	0,28	0,88	0,18	0,20
TRExOE		0,19	0,14	0,58	0,35	0,36	0,14	0,99	0,05	0,53
Fatores Principais										
TRE	100	1458	527	555ab	386	290	258	3,83	1,86	2,20
	110	1439	515	511b	394	308	263	3,67	1,70	1,96
	120	1486	544	568a	396	293	266	3,79	1,88	2,12
OE	Sem	1475	542	554	394	290	257	3,77	1,90	2,17
	Com	1447	516	535	389	304	268	3,75	1,73	2,01

¹ Treonina; ² Óleos Essenciais.

Tabela 9 - Desdobramento da interação entre níveis crescentes de treonina digestível e óleos essenciais para a relação vilo:cripta no jejuno aos 21 dias de idade

Jejuno				
Oleos Essenciais	Treonina Digestível (% da recomendação)			Valor de P
(ppm)	100	110	120	
0	2,09a	1,86	1,74	0,2717
100	1,62b	1,55	2,01	0,0835
Valor de P	0,0376	0,1558	0,2201	

Aos 40 dias de idade, não foi encontrado nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) nas variáveis morfométricas avaliadas. Trabalhos anteriores relatam que a deficiência de treonina pode afetar negativamente a altura de vilos, profundidade de cripta e o número de células caliciformes do trato gastrointestinal (LAW et al., 2007; WANG et al., 2010). Por outro lado, a suplementação de treonina na dieta pode ser benéfica para a morfometria intestinal como demonstrado por Abassi et al. (2014), que, trabalhando com frangos de corte, encontraram maior altura de vilo e menor profundidade de cripta com consequente aumento na relação vilo:cripta aos 42 dias de idade nos animais que receberam 110% das recomendações de treonina do manual da linhagem Ross. Outro fator importante é que com o avanço da idade a velocidade da renovação celular da mucosa intestinal tende a diminuir, apesar de ser mais acelerado em aves que entraram em contato com algum agente causador de lesão, como as coccídias (PELICIA et al., 2011). Dessa maneira, com os resultados obtidos nessa pesquisa, é possível concluir que os animais tiveram suas exigências nutricionais de treonina supridas. Além disso, a adição dos princípios ativos capsaicina e cúrcuma na dieta de frangos de corte não modificou a morfometria do trato intestinal desses animais aos 40 dias de idade.

Tabela 10 - Valores médios de altura de vilos (AV), profundidade de criptas (PC) e relação vilo:cripta (V:C) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 40 dias idade

Tratamentos	Altura de Vilos (μm)			Profundidade de Cripta (μm)			Vilo:Cripta		
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
100% TRE ¹	1940	1314	1145	400	243	207	4,90	5,49	5,61
110% TRE	1870	1326	1092	364	224	189	5,17	6,03	5,83
120% TRE	1880	1223	1049	400	223	210	4,72	5,52	5,04
100% TRE + OE ²	1855	1300	1059	378	228	186	4,93	5,81	5,69
110% TRE + OE	1818	1206	1024	360	229	196	5,05	5,35	5,28
120% TRE +OE	1933	1269	1052	390	228	182	5,01	5,63	5,85
CV	8,15	8,56	13,80	10,72	13,89	14,72	9,88	13,96	15,20
ANOVA	VALOR DE P								
TRE	0,59	0,38	0,69	0,12	0,73	0,92	0,47	0,94	0,84
OE	0,60	0,42	0,34	0,40	0,86	0,15	0,70	0,76	0,70
TRExOE	0,55	0,18	0,76	0,85	0,70	0,31	0,61	0,30	0,16
Fatores Principais									
TRE	100	1897	1307	1102	389	235	196	4,92	5,65
	110	1844	1266	1058	362	227	192	5,11	5,69
	120	1907	1246	1050	395	225	196	4,86	5,58
OE	Sem	1897	1287	1095	388	230	202	4,93	5,68
	Com	1869	1259	1045	376	228	188	5,00	5,61

¹ Treonina; ² Óleos Essenciais.

4.3 Quantidade de Mucina no conteúdo ileal

Não houve efeito dos tratamentos sobre a quantidade de mucina no conteúdo ileal de frangos de corte aos 40 dias de idade (Tabela 11). Alguns aminoácidos são responsáveis por mudanças na secreção de mucina e devem afetar diretamente as células caliciformes ou ainda, o sistema nervoso entérico promovendo uma alteração na produção de mucina (MONTAGNE et al., 2000; CLAUSTRE et al., 2002; FAURE et al., 2005). Ao contrário deste trabalho, Azzam et al. (2011) trabalhando com poedeiras encontraram um aumento linear na expressão do gene MUC2 no jejuno e íleo dos animais com o aumento dos níveis de treonina na dieta. A produção de mucina é aumentada durante uma inflamação intestinal (DEPLANCKE e GASKINS, 2001). Isso não foi observado possivelmente pelo fato da análise da produção de mucina ter sido feita aos 40 dias de idade das aves e nesse período não havia um processo inflamatório decorrente do desafio a que as aves foram submetidas aos 14 dias de idade.

Tabela 11 - Quantidade de mucina no conteúdo ileal de frangos de corte aos 40 dias de idade

Tratamentos	Mucina g /kg MS de conteúdo ileal
100% TRE	37,16
110% TRE	27,77
120% TRE	27,69
100% TRE + OE	30,66
110% TRE + OE	35,08
120% TRE +OE	25,94
CV	31,44
ANOVA	Valor de P
TRE	0,1933
OE	0,9221
TRExOE	0,2264
Fatores Principais	
TRE	33,91
	31,43
	26,81
OE	30,88
	30,56

4.4 Microbiota intestinal

4.4.1 Análise do índice de riqueza e diversidade (alfa-diversidade)

Os dados do índice de riqueza e diversidade do intestino delgado e ceco estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente. De maneira geral, os índices de riqueza e diversidade do ceco foram maiores do que os do intestino delgado. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Pourabedin e colaboradores (2015), que observaram maior índice de riqueza e diversidade no ceco comparado ao íleo em frangos de corte. O baixo turnover do conteúdo no ceco dos animais faz com que o número e a diversidade de micro-organismos aumentem de maneira expressiva, com predominância de populações anaeróbias estritas.

No intestino delgado, não houve diferença estatística nos índices avaliados, isso significa que não houve variação no número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) encontradas e na diversidade da comunidade bacteriana nesse segmento do trato gastrointestinal de acordo com os tratamentos.

Tabela 12 - Índices de riqueza e diversidade bacteriana no conteúdo do intestino delgado

Tratamentos		RIQUEZA	DIVERSIDADE
100% TRE ¹		13096	4,95
110% TRE		13543	5,43
120% TRE		10112	4,85
100% TRE + OE ²		10174	5,25
110% TRE + OE		10727	4,91
120% TRE +OE		11665	5,46
CV		44,37	9,67
ANOVA			
TRE		0,8878	0,9560
OE		0,5134	0,5211
TRExOE		0,6168	0,0941
TRE	100	11635	5,10
	110	12135	5,17
	120	10888	5,16
OE	Sem	12250	5,08
	Com	10855	5,21

¹ Treonina; ² Óleos Essenciais.

O índice de riqueza do conteúdo do ceco variou com a inclusão de óleo essencial na dieta. A presença do óleo essencial aumentou o índice de riqueza, mostrando com isso um aumento no número de OTU's encontradas no ceco.

Tabela 13 - Índices de riqueza e diversidade bacteriana no conteúdo do ceco

Tratamentos		RIQUEZA	DIVERSIDADE
100% TRE		27927	6,47
110% TRE		28467	6,16
120% TRE		26852	6,23
100% TRE + OE		23778	6,59
110% TRE + OE		52112	6,19
120% TRE +OE		52684	6,29
CV		45,78	5,44
ANOVA			
TRE		0,1573	0,1274
OE		0,0343*	0,6375
TRExOE		0,1468	0,9656
TRE	100	25852	6,53
	110	40290	6,18
	120	39768	6,26
OE	Sem	27749b	6,29
	Com	42858a	6,35

4.4.2 Análise de coordenadas principais (β - diversidade)

A análise de coordenadas principais (PCoA), levando em consideração a abundância dos grupos, demonstra que a comunidade bacteriana do conteúdo do intestino delgado é diferente da comunidade do ceco (Figura 6).

Figura 6 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos perfis relativos às comunidades bacterianas do conteúdo do intestino delgado e ceco

Na Figura 7 é possível observar que os níveis de inclusão de treonina na dieta influenciaram na caracterização da comunidade bacteriana do intestino delgado dos animais. A inclusão de 120% de treonina digestível na dieta tende a modificar a abundância da comunidade bacteriana quando comparado aos demais tratamentos.

Figura 7 - PcoA do intestino delgado levando em consideração o nível de treonina na dieta

Diferente do observado no intestino delgado, quando observamos o ceco não encontramos diferença na comunidade bacteriana quando alteramos o nível de inclusão de treonina na dieta (Figura 8). Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de grande parte do processo digestivo e absoritivo serem no intestino delgado, fazendo com que a porção do conteúdo que chega ao ceco para sofrer a ação das bactérias presentes nesse segmento, não seja muito diferenciada entre os tratamentos.

Figura 8 - PCoA do ceco levando em consideração a inclusão de treonina na dieta

Na Figura 9 e 10 é possível observar que a inclusão de óleo essencial na dieta não influencia na abundância da comunidade bacteriana do intestino delgado e ceco, respectivamente. Talvez a ausência de resposta com a inclusão do óleo essencial seja em decorrência de sua baixa inclusão na dieta.

Figura 9 - PCoA do intestino delgado levando em consideração a inclusão de óleo essencial na dieta

Figura 10 - PCoA do ceco levando em consideração a inclusão de óleo essencial na dieta

4.4.3 Sequenciamento – Frequência dos gêneros

As frequências dos principais gêneros bacterianos encontrados com o sequenciamento do material coletado do ceco estão apresentadas na Tabela 14. O gênero de mais alta frequência foi *Lactobacillus*, seguido de *Bacteroides* e *Rumincoccus*. De uma forma geral, os tratamentos não modificaram a frequência dos principais gêneros no ceco dos animais. No entanto, é possível observar uma tendência ($p < 0,08$) de interação dos fatores no gênero *Bacteroides*. Na ausência de aditivo, a inclusão crescente de treonina digestível na dieta tende a diminuir a frequência de *Bacteroides* no ceco. Quando o aditivo está presente na dieta, o nível crescente de treonina digestível não aumenta a frequência desse gênero. Al-Sheikly e Al-Saieg (1980) relataram que algumas espécies do gênero *Bacteroides* podem ser benéficas para o hospedeiro, já que as bactérias pertencentes a este grupo apresentam alta atividade hidrolítica, sendo um grupo eficiente em degradar carboidratos indigestíveis, incluindo polissacarídeos não amiláceos e celulose. No entanto, em um experimento realizado por Bortoluzzi *et al.* (2015) ocorreu uma tendência ($p = 0,07$) dos animais que foram desafiados apresentarem maior

concentração de bactérias do gênero *Bacteroides* no ceco, apresentando menor desempenho quando comparado aos demais tratamentos. Observando a conversão alimentar dos animais que receberam 120% da recomendação de treonina digestível na dieta, aos 21 dias de idade, temos que estes tiveram uma pior conversão alimentar comparado aos animais que receberam 100% de treonina digestível (1,474 vs 1,444). Portanto, podemos concluir que nesse experimento o gênero *Bacteroides* pode estar relacionado com uma melhor eficiência alimentar, discordando dos resultados encontrados por Bortoluzzi et al. (2015).

Além disso, existe a tendência de o óleo essencial diminuir a frequência de *Ruminococcus* no ceco de frangos de corte ($p < 0,07$). Bactérias desse gênero podem estar relacionadas com a degradação de fibra da dieta, no entanto essa característica não é fundamental nesse experimento, já que as dietas foram à base de milho e farelo de soja, ingredientes com baixo teor de fibra.

Tabela 14 - Frequência (%) dos gêneros predominantes no conteúdo do ceco das aves

Tratamentos		<i>Lact.</i> ³	<i>Bact.</i> ⁴	<i>Rumi.</i> ⁵	<i>Faec.</i> ⁶	<i>Blautia</i>	<i>Osci.</i> ⁷	<i>Dorea</i>
100% TRE ¹		24,16	16,40	10,28	3,63	3,09	1,78	1,46
110% TRE		29,81	13,84	10,67	1,96	2,35	1,82	1,04
120% TRE		26,76	9,21	11,01	3,37	2,86	2,01	1,39
100% TRE + OE ²		21,34	13,81	10,36	4,65	2,82	2,04	1,34
110% TRE + OE		35,62	8,63	9,41	3,66	3,66	2,02	1,52
120% TRE +OE		37,09	22,21	4,38	3,70	1,10	1,80	1,26
ANOVA								
TRE		0.4787	0.5185	0.2491	0.5688	0.6061	0.9996	0.8896
OE		0.5507	0.6157	0.0711	0.3278	0.7956	0.8649	0.7187
TRExOE		0.7600	0.0873	0.1299	0.8585	0.4194	0.9054	0.3872
TRE	100	22,75	15,11	10,32	4,14	2,95	1,91	1,40
	110	32,72	11,24	10,04	2,81	3,00	1,92	1,28
	120	31,93	15,71	7,70	3,54	1,98	1,90	1,33
OE	Sem	26,91	13,15	10,65	2,99	2,77	1,87	1,30
	Com	31,35	14,89	8,05	4,00	2,52	1,95	1,37

¹ Treonina; ² Óleos Essenciais; ³ *Lactobacillus*; ⁴ *Bacteroides*; ⁵ *Ruminococcus*; ⁶ *Faecalibacterium*; ⁷ *Oscillospira*

As frequências dos gêneros predominantes no conteúdo do intestino delgado estão apresentadas na Tabela 15. Mais de 90% das bactérias foram do gênero *Lactobacillus*, com cerca de 2% de *Streptococcus* e 1% de *Enterococcus*. Houve efeito significativo da inclusão de 120% de treonina digestível na dieta quando comparado a 110% de inclusão, com aumento no gênero *Staphylococcus*. Essa diferença pode ter sido encontrada em decorrência da competição por nutrientes que pode ocorrer entre as diferentes bactérias, fazendo com que as concentrações de determinadas bactérias variem de acordo com os nutrientes disponíveis. Apesar de não significativo, podemos observar que as aves suplementadas com 110% de treonina digestível tiveram a tendência de possuir uma maior concentração de *Lactobacillus* no conteúdo do intestino delgado do que as aves alimentadas com 120% de treonina digestível (93,35% vs 89,30%).

Tabela 15 - Frequência (%) dos gêneros predominantes no conteúdo do intestino delgado das aves

Tratamentos		LA	EN	ST	STA	CO	AE
100% TRE ¹		92,59	0,80	2,00	0,22	0,38	0,07
110% TRE		94,70	0,54	0,88	0,14	0,26	0,05
120% TRE		91,34	1,21	1,98	0,24	0,18	0,06
100% TRE + OE ²		91,10	0,93	0,99	0,17	0,10	0,07
110% TRE + OE		92,00	0,74	3,53	0,16	0,16	0,08
120% TRE +OE		87,26	1,62	2,48	0,45	0,32	0,20
ANOVA							
TRE		0.1478	0.0557	0.7135	0.0146	0.9467	0.3822
OE		0.1055	0.3298	0.3934	0.2641	0.4767	0.1966
TRExOE		0.8098	0.8944	0.2128	0.1083	0.2857	0.3609
TRE	100	91,84	0,87	1,50	0,19ab	0,24	0,07
	110	93,35	0,64	2,21	0,14b	0,21	0,07
	120	89,30	1,41	2,23	0,34a	0,25	0,13
OE	Sem	92,88	0,85	1,62	0,20	0,27	0,06
	Com	90,12	1,10	2,34	0,26	0,20	0,12

¹ Treonina; ² Óleos essenciais; LA = *Lactobacillus*; EM=*Enterococcus*; ST= *Streptococcus*; STA= *Staphylococcus*; CO= *Corynebacterium*; AE= *Aerococcus*

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese deste trabalho de que a adição de óleos essenciais na dieta de frangos de corte poderia aumentar a produção de mucina e consequentemente aumentar a exigência de treonina dos animais não foi comprovada. Com os dados apresentados é possível concluir que a suplementação de óleos essenciais na dieta de frangos de corte não aumenta a exigência de treonina, já que a inclusão de níveis crescentes desse aminoácido na dieta não proporcionou melhora no desempenho de frangos de corte.

Fica evidente o distanciamento da comunidade microbiana do intestino delgado e ceco. No entanto, a inclusão de níveis crescentes de treonina digestível e óleos essenciais na dieta, não modifica a população microbiana, podendo ser observado apenas tendências de alterações nas frequências de alguns gêneros no ceco dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.A.; MAHDAVI, A.H.; SAMIE, A.H.; JAHANIAN, R. Effects of different levels of dietary crude protein and threonine on performance, humoral immune responses and intestinal morphology of broiler chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.16, n.1, p. 35-44, 2014.
- ABILDGAARD, L.; HOJBERG, O.; SCHRAMM, A.; BALLE, K.M.; ENGBERG, R.M. The effect of feeding a commercial essential oil product on *Clostridium perfringens* numbers in the intestine of broiler chickens measured by real-time PCR targeting the *stx* toxin-encoding gene (*plc*). **Animal feed Science and Technology**. Philadelphia, v. 157, n. 3, p. 181-189, 2010.
- ALP, M.; MIDILLI, M.; KOCABAĞLI, N.; YILMAZ, H.; TURAN, N.; GARGILI, A.; ACAR, N. The effects of dietary oregano essential oil on live performance, carcass yield, serum immunoglobulin G level, and oocyst count in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 21, n.3, p. 630-636, 2012.
- AL-SHEIKHLY, F.; AL-SAIEG A. Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian Disease**, Jacksonville, v.24, n.2, p.324–333, 1980.
- AZZAM, M.M.M.; ZOU, X.T.; DONG, X.Y.; XIE, P. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. **Poultry Science**, Champaign, v.90, n.10, p.2251–2256, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, Boston, v.46, n.2, p. 446-475. 2008.
- BASMACIOGLU, H.; TOKUSOGLU, O. ; ERGUL, M. The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFAs in broilers. **South African Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 34, n.3, p. 197–210, 2004.
- BONA, T.D.M.M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L.B.; KURITZA, L.N; VASCONCELOS, S.P.; SANTIN, E. Oregano, rosemary, cinnamon essential oil and pepper extract to control Salmonella, Eimeria and Clostridium in broiler chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n. 5, p. 411-418, 2012.
- BORTOLUZZI, C.; MENTEN, J.F.M; PEREIRA, R.;FAGUNDES, N.S.; NAPT, G. S.; PEDROSO, A.A.;BIGATON, A.D. ; ANDREOTE, F.D. Hops β -acids and zinc bacitracin affect the performance and intestinal microbiota of broilers challenged with Eimeria acervulina and Eimeria tenella. **Animal Feed Science and Technology**, Apopka, v. 207, p. 181- 189, 2015.
- BRAVO, D.; PIRGOZLIEV, V.; ROSE, S.P. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsaicin oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. **Journal of Animal Science**, Hatfield , v. 92, n. 4, p. 1531-1536, 2014.

BRAVO, D.; UTTERBACK, P.; PARSONS, C.M. Evaluation of a mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin for improving growth performance and metabolizable energy in broiler chicks fed corn and soybean meal. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 20, n. 2, p. 115–120, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 94, n.3, p. 223-253, 2004.

CABUK, M.M.; BOZKURT, A.; ALCICEK, Y.; AKBAS, K. e KU" CU" KYILMAZ. Effect of a herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. **South African Journal of Animal Science**. Hatfield, v. 36, n. 2, p. 135–141, 2006.

CLAUSTRE, J.F.; TOUMI, A.; TROMPETTE, G.; JOURDAN, H.; GUIGNARD, J.A.; CHAYVIALLE ; PLAISANCIE, P. Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. **American Journal Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 3, p. 521–528, 2002.

DEPLANCKE, B. ; GASKINS, H.R. Microbial modulation of innate defence: Goblet cells and the intestinal mucus layer. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n. 6, p. 1131–1141, 2001.

DURRANI, F.R.; ISMAIL, M.; SULTAN, A.; SUHAIL, S.M.; CHAND, N. ; DURRANI, Z. Effect of different levels of feed added Turmeric (*Curcuma longa*) on the performance of broiler chicks. **Journal of Agricultural and Biological Science**, Pakistan, v.1, n.2, p. 9-11, 2006.

FAURE, M.; CHONE, F.; METTRAUX, C.; GODIN, J.P.; BECHEREAU, F.; VUICHOD, J.; PAPET, I.; BREUILLE, D. ; OBLED, C. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. 7, p. 1802–1807, 2007.

FAURE, M.; METTRAUX, C.; MOENNOZ, D.; GODIN, J.P.; VUICHOD, J.; ROCHAT, F.; BREUILLE, D.; OBLED, C.E CORTHESEY-THEULAZ, I. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, n. 6, p.1558–1564, 2006.

FAURE, M.; MOËNNOZ, D.; MONTIGON, F.; FAY, L.B.; BREUILLÉ, D.; FINOT, P. A.; BALLÈVRE, O.; BOZA, J. Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v.307, n.2, p. 244-251, 2002.

FAURE, M.; MOENNOZ, D.; MONTIGON, F.; METTRAUX, C.; BREUILLE, D.; BALLEVRE, O. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.135, n.3, p. 486–491, 2005.

FRANCESH, M.; BRUFAU, J. Nutritional factors affecting excreta/litter moisture and quality. **World's Poultry Science**, Wallingford, v.60, n.1, p. 64-75, 2004.

FORSTNER, J.F. ; FORSTNER, G.G. Gastrointestinal mucus.In: JOHNSON,L.R.(Ed.). **Physiology of the gastrointestinal tract** New York:Raven press, USA. 1994. p. 1255–1284.

GARCIA, V. citar todos et al. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology and meat yield of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 16, n. 4, p. 555 -562, 2007.

GOWDA, N.K.S.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BERMUDEZ, A.J; CHEN, Y.C. Efficacy of Turmeric (*Curcuma longa*), containing a known level of curcumin, and a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.87, n.6, p. 1125–1130, 2008.

HENN, J.D.; BERTOL, T.M.; MOURA, N.F.; COLDEBELLA, A.; BRUM, P.A.R.; CASAGRANDE, M. Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n.8, p. 1761-1767, 2010.

HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V.; ORENGO, J.; MEGIAS, M.D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n.2, p. 169-174, 2004.

HORN, N.L.; DONKIN, S.S.; APPLEGATE, T.J.; ADEOLA O. Intestinal mucin dynamics: Response of broiler chicks and White Pekin ducklings to dietary threonine. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n.9, p. 1906-1914, 2009.

HOOPER, L.V.; GORDON, J.I. Commensal Host-bacterial relationship in the gut. **Science**, Washington, v.292, n.5519, p. 1115-1118, 2001.

JAMROZ, D.; KAMEL, C. Plant extracts enhance broiler performance. **Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 80, p.41, 2002. (suppl. 1).

JAMROZ, D.; WERTELECKI, T.; HOUSZKA, M.; KAMEL, C. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlim, v. 90, n.5, p. 255–268, 2006.

JAMROZ, D.; WILICZKIEWICZ, A.; WERTELECKI, T.; ORDA, J.; SKORUPINSKA, J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. **British Poultry Science**, London, v. 46, n.4, p. 485–493, 2005.

KARADAS, F.; PIRGOZLIEV, V.; ROSE, S.P.; DIMITROV, D.; ODUGUWA, O.; BRAVO, D. Dietary essential oils improve the hepatic antioxidative status of broiler chickens. **British Poultry Science**, London, v. 55, n. 3, p. 329-334, 2014.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plant extracts. Feed Mix - **The International Journal on Feed, Nutrition and Technology** - Special: Alternatives to antibiotics. Doetinchen, 2000. p. 19-21.

KIM, D.K.; LILLEHOJ, H.S.; LEE, S.H.; JANG, S.I.; BRAVO, D. High-throughput gene expression analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral feeding of carvacrol, cinnamaldehyde, or *Capsicum* oleoresin. **Poultry Science**, Champaign, v.89, n. 1, p. 68–8, 2010.

KIM, D.K.; LILLEHOJ, H.S.; LEE, S.H.; JANG, S.I.; LILLEHOJ, E.P.; BRAVO, D. Dietary *Curcuma longa* enhances resistance against *Eimeria máxima* and *Eimeria tenella* infections in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, n.10, p. 2635–2643, 2013.

LAW, G.K.; BERTOLO, R.F. ;ADJIRI-AWERE, A. ;PENCHARZ, P.B. ; BALL, R.O.. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 292, n.5, p. G1293-G1301, 2007.

LEE, K.W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H.J.; YEOM, K.H. ; BEYNEN, A.C. Dietary Carvacrol Lowers Body Weight Gain but Improves Feed Conversion in Female Broiler Chickens. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v. 12, v.4, p. 394–399, 2003.

LEE, K.W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H.J.; FREHNER, M.; LOSA, R. ; BEYNEN, A.C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**, London, v. 44, n. 3, p.450–457, 2003

LEE, S.H.; LILLEHOJ, H.S.; JANG, S.I.; LILLEHOJ, E.P.; MIN, W.E BRAVO, D. M. Dietary supplementation of young broiler chickens with Capsicum and turmeric oleoresins increases resistance to necrotic enteritis. **British Journal of Nutrition**, London, v. 110, n.5, p. 840–847, 2013.

MCELROY, A.P.; MANNING, J.G.; JAEGER, L.A.; TAUB, M.; WILLIAMS, J.D.; HARGIS, B.M. Effect of prolonged administration of dietary capsaicin on broiler growth and Salmonella enteritidis susceptibility. **Avian Disease**, cidedad,v, 38, n. 2, p. 329-333, 1994.

Mc LEOD, M. Effect of amino acid balance and energy: protein ratio on energy and nitrogen metabolism in male broiler chicken. **British Poultry Science**, Edinburg, IK, v.38, p. 405-411,1997.

MITSCH, P.; ZITTERL-EGLESEER, K.; KOHLER, B.; GABLER, C.; LOSA, R.; ZIMPERNIK, I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 669-675, 2004.

MONTAGNE, L.; TOULLEC, R.; LALLES, J.P. Calf intestinal mucin: Isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 507–517, 2000.

MUHL, A.; LIBERT, F. Growth, nutrient utilization and threonine requirement of growing chicken fed threonine limiting diets with commercial blends of phytogenic feed additives. **The Journal of Poultry Science**, Champaign, v. 44, p. 297 – 304, 2007.

MURAKAMI, A.E.; EYNG, C.E ;TORRENT, J. Effects of Functional Oils on Coccidiosis and Apparent Metabolizable Energy in Broiler Chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Gwanak-gu, v. 27, p. 981-989, 2014.

OSPINA-ROJAS, I.C.; MURAKAMI, A.E.; OLIVEIRA, C.A.L.; GUERRA, A.F.Q.G. Supplemental glycine and threonine effects on performance, intestinal mucosa development, and nutrient utilization of growing broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, p. 2724-2731, 2013.

PERIC, L.; MILOSEVIC, N.; ZIKIC, D.; BJEDOV, S.; CVETKOVIC, D.; MARKOV, S.; MOHNL, M.; STEINER, T. Effects of probiotic and phytogenic products on performance, gut morphology and cecal microflora of broiler chickens. **Archives of Animal Breeding**, Dummerstorf, v. 53, p. 350–359, 2010.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v. 47, n.1, p. 55-59, 1996.

POURABEDIN, M.; GUAN, L. ; ZHAO, X. Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. **Microbiome**, London, v. 3, p. 15-27, 2015.

PUIMAN, P.J.; JENSEN, M.; STOLL, B.; RENES, I.B.; DE BRUIJN, A.C.; DORST, K.; SCHIERBEEK, H.; SCHMIDT, M.; BOEHM, G.; BURRIN, D. G.; SANGILD, P. T.; VAN GOUDOEVER, J. B. Intestinal threonine utilization for protein and mucin synthesis is decreased in formula-fed preterm pigs. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 141, p. 1306-1311, 2011.

REEDS, P.J.; JAHOOOR F. The amino acid requirements of disease. **Clinical Nutrition**, Luxembourg, v.20, p. 15–22, 2001.

RHODES J.M. Colonic mucus and mucosal glycoproteins: the key to colitis and cancer? **Gut**, London, v. 30, n.12, p. 1660–1666, 1989.

STAR, L.; ROVERS, M.; CORRENT, E.; VAN DER KLIS J. D. Threonine requirement of broiler chickens during subclinical intestinal *Clostridium* infection. **Poultry Science**, Champaign, v.91, p. 643-652, 2012.

STOLL, B.; HENRY, J.; REEDS, P.J.; YU, H.; JAHOOOR, F.; BURRIN, D.G.; Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 606 – 614, 1998.

STROUS, G.J. ; DEKKER, J. Mucin-type glycoproteins. **Biochemistry and Molecular Biology**, Malden, v. 27, p. 57–92, 1992.

TELLEZ, G.I.; JAEGER, L.; DEAN, C.E.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R.; WILLIAMS, J.D.; HARGIS, B.M. Effect of prolonged administration of dietary capsaicin on *Salmonella enteritidis* infection in leghorn chicks. **Avian Disease**, Jacksonville, v.37, n.1, p.143-148, 1993.

TSIRTSIKOS, P.; FEGEROS, K.; KOMINAKIS, A.; BALASKAS, C.; MOUNTZOURIS, K.C. Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary phytogetic inclusion level in broilers. **Animal**, London, v.6, p. 1049–1057, 2012.

VAN DER WAAIJ, D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 43, p.69–87, 1989.

XIE, M.; ZHANG, L.; WENA, Z. G.; TANGA, J.; HUANG, W. E HOU, S. S. Threonine requirement of White Pekin ducks from hatch to 21 d of age. **British Poultry Science**, Edinburg, v. 55, n. 4, p. 553–557, 2014.

WANG, W.; ZENG, X.; MAO, X.; WU, G. ; QIAO, S. Optimal dietary true ileal digestible threonine for supporting the mucosal barrier in small intestine of weanling pigs. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 140 p. 981-986, 2010.

WILS-PLOTZ, E.L.; JENKINS, M.C.; DILGER, R.N. Modulation of the intestinal environment, innate immune response, and barrier function by dietary threonine and purified fiber during a coccidiosis challenge in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.92, p. 735–745, 2013.