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

**Desempenho produtivo e microbiota intestinal de frangos de corte
suplementados com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) após
desafio com *Eimeria acervulina* e *E. tenella***

Cristiano Bortoluzzi

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

**Piracicaba
2013**

Cristiano Bortoluzzi
Médico Veterinário

**Desempenho produtivo e microbiota intestinal de frangos de corte
suplementados com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) após desafio com
Eimeria acervulina e *E. tenella***

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

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

Piracicaba
2013

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

Bortoluzzi, Cristiano

Desempenho produtivo e microbiota intestinal de frangos de corte suplementados com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) após desafio com *Eimeria acervulina* e *E. tenella* / Cristiano Bortoluzzi. - - Piracicaba, 2013.
77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Aditivos fitogênicos 2. Coccidiose 3. Ecologia microbiana 4. Saúde intestinal
I. Título

CDD 636.513
B739d

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

À Deus e Nossa Senhora por sempre guiar meus passos

Dedico

Aos meus pais Eugênio e Sonia por abrir mão de seus sonhos

para que eu pudesse realizar os meus.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que em algum momento precisamos de alguém. É reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autosuficiente. Por isso, meus sinceros agradecimentos...

À Deus, ser supremo e justo que tudo sabe e sempre me acompanha.

Aos meus pais, Eugênio e Sonia pelo amor e apoio incondicional para a conclusão de mais esta etapa, e por todas outras que virão. À minha irmã e meu cunhado pelo apoio e constantes ajudas.

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

Ao CNPq e à FAPESP pela concessão da bolsa de estudos, em especial à FAPESP pela concessão da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior.

Ao Prof. José Fernando Machado Menten, pela valiosa orientação e paciência durante o curso de Mestrado. Além disso, minha eterna e sincera gratidão pela oportunidade de realizar um Estágio de Pesquisa no Exterior.

Ao Prof. Valdomiro Shigueru Miyada pelos ensinamentos técnicos e científicos.

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia pela busca da excelência de seus alunos.

Ao Prof. Fernando Dini Andreote do Departamento de Ciência dos Solos pelo auxílio nas análises da microbiota intestinal, e aos funcionários Fernando e Denise pela constante colaboração.

À Adriana Pedroso pela ajuda nas análises e interpretação dos resultados da microbiota intestinal.

Ao Fernando Feitosa pelo fornecimento do β -ácido para realização dos experimentos.

.

Ao Prof. Marcos Rostagno da Purdue University, pela preciosa orientação durante o estágio no exterior.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Pastagens pela convivência durante o curso de mestrado, em especial: Rafaela, Naiara, Gláucia, Fernando, João Pedro, Renan, Maicon, Gislaine e Jaqueline. Agradecimento especial devo à Rafaela Pereira pelo auxílio e ensinamentos das análises da microbiota intestinal.

Aos amigos de república Silas, Alfredo e Rafaela pela amizade.

Aos amigos Hebert e Cesar que muito me ajudaram durante minha permanência no exterior.

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

Ao funcionário da Fábrica de rações (Antonio Carlos) pela ajuda no preparo das rações experimentais.

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

“Se eu vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

Issac Newton

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Importância da Microbiota Intestinal em frangos de corte	17
2.2 Coccidiose aviária e aditivos fitogênicos: Desempenho e Microbiota Intestinal ...	22
2.3 Extrato de Lúpulo e possível uso como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho em dietas de frangos de corte.....	26
3 MATERIAL E METODOS.....	29
3.1 Experimento 1	29
3.1.1 Experimento de Campo.....	29
3.1.2 Análise estatística	32
3.2 Experimento 2	33
3.2.1 Experimento de campo.....	33
3.2.2 Análise estatística	37
3.2.3 Análise da microbiota intestinal	37
3.2.3.1 Preparo do pélete bacteriano.	37
3.2.3.2 Extração do DNA das amostras do conteúdo intestinal.....	40
3.2.3.3 Amplificação e Sequenciamento do 16S rDNA bacteriano.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Experimento 1	43
4.2 Experimento 2	47
4.2.1 Ensaio de campo.....	47
4.2.2 Microbiota Intestinal.....	55
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS.....	69

RESUMO

Desempenho produtivo e microbiota intestinal de frangos de corte suplementados com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) após desafio com *Eimeria acervulina* e *E. tenella*

Este estudo teve por objetivos avaliar diferentes níveis de suplementação de β -ácidos do lúpulo como aditivos de rações para frangos de corte sobre o desempenho e a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal após desafio com *Eimeria*. No experimento 1, foram alojados 1440 pintos de corte da linhagem Cobb 500, no período de 1 a 42 dias de idade, com 6 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos utilizados foram: controle negativo, ração sem antimicrobiano; controle positivo, ração com 30 mg/kg de bacitracina de zinco e rações com 30, 60, 120 ou 240 mg/kg de β -ácidos do lúpulo, compondo 4 tratamentos adicionais. Os β -ácidos foram microencapsulados com 30% de extrato. As rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja, com inclusão de 5% de farelo de trigo e 5% de farinha de penas e vísceras. Aos 7 dias de idade todas as aves foram vacinadas contra coccidiose. As aves e as rações foram pesadas semanalmente para cálculo de desempenho. No experimento 2, foram alojados 1440 pintos de corte da linhagem Ross 308, no período de 1 a 42 dias de idade, com 6 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos foram: controle negativo, dieta basal; controle positivo, ração com 30 mg/kg de bacitracina de zinco; controle negativo mais desafio; controle positivo mais desafio; controle negativo suplementado com 30 mg/kg de β -ácidos mais desafio; controle negativo suplementado com 240 mg/kg de β -ácidos mais desafio. As rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja com inclusão de 5% de farinha de penas e vísceras. Aos 14 dias de idade, as aves dos tratamentos 3, 4, 5 e 6 foram desafiadas, via oral, com 2×10^5 e 5×10^4 oocistos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella*, respectivamente. As aves e as rações foram pesadas semanalmente para obtenção dos dados de desempenho. Aos 21 e 35 dias de idade das aves, coletou-se o conteúdo do intestino delgado e cecos das aves para análise da microbiota intestinal, com auxílio de técnicas moleculares. No experimento 1, aos 21 dias de idade as aves os tratamentos com 30 ou 60 mg/kg de β -ácidos apresentaram desempenho semelhante às do controle positivo. Aos 42 dias houve melhora na conversão alimentar das aves recebendo 30 e 240 mg/kg de β -ácidos ou antimicrobiano. No segundo experimento, a coccidiose causou significativa redução no desempenho das aves e nenhum dos aditivos utilizados foi capaz de reverter esta situação. Houve aumento de bactérias do gênero *Clostridium* no intestino delgado aos 21 dias, em consequência do desafio, entretanto, o maior nível de β -ácidos reduziu esta população. Aos 35 dias de idade a infecção de coccidiose não alterou a comunidade bacteriana do intestino delgado, mas nos cecos houve aumento do gênero *Bacteroides*. Os β -ácidos possuem potencial para serem utilizados nas dietas de frangos de corte em situações de baixo desafio, e podem auxiliar no controle da proliferação de *Clostridium*, embora ineficazes contra a *Eimeria*.

Palavras-chave: Aditivos fitogênicos; Coccidiose; Ecologia microbiana; Saúde intestinal

ABSTRACT

Performance and intestinal microbiota of broiler chickens supplemented with hops β -acids (*Humulus lupulus*) following challenge with *Eimeria acervulina* and *E. tenella*

The objective was to evaluate increasing level of hops β -acids in the feed on performance of broiler chickens. A pen trial using 1440 one-day old chickens, from 1 to 42 days, with 6 treatments and 6 replicates was conducted (Experiment 1). The experimental treatments were: negative control, basal diet; positive control, basal diet supplemented with zinc bacitracin, 30 mg/kg; and basal diet supplemented with 30, 60, 120 or 240 mg/kg of hops β -acids, for 4 additional treatments. The corn soybean meal basal diet was formulated with inclusion of 5% poultry by-product meal and 5% wheat bran. At 7 days of age all birds were vaccinated against coccidiosis. The chickens and the feed were weighted weekly to calculate the performance. In the second experiment, the objective was to evaluate the supplementation of hops β -acids on performance and the balance of intestinal microbiota of broilers, following challenge with *Eimeria acervulina* and *E. tenella*. A pen trial using 1440 one-day-old chickens, from 1 to 42 days, with 6 treatments and 6 replicates was conducted. The experimental treatments were: negative control, basal diet; positive control, basal diet supplemented with zinc bacitracin, 30 mg/kg; negative control + challenge; Positive control + challenge; negative control supplemented with 30 mg/kg of hops β -acids + challenge; negative control supplemented with 240 mg/kg of hops β -acids + challenge. The corn soybean meal basal diet was formulated with inclusion of 5% poultry by-product meal. At 14 days of age, the birds in treatments 3, 4, 5 and 6 were challenged with 2×10^5 and 5×10^4 oocysts of *Eimeria acervulina* and *E. tenella*, respectively. The chickens and the feed were weighted weekly to calculate the performance. At 21 and 35 days of age, the small intestine and ceca content was collected to analyze the intestinal microbiota, using molecular techniques. In the first experiment, at 21 days of age the treatment with 30 or 60 mg/kg of β -acids had the same performance of chickens in positive control. At 42 days, the treatments containing 30 or 240 mg/kg of β -acids and positive control had improved feed conversion. In the second experiment, there was worse performance in broilers chickens challenged with coccidiosis and the additives were not able to oppose this situation. There was increase in the *Clostridium* population in the small intestine at 21 days, due to challenge, however, the highest level of β -acids decreasead this genus. At 35 days, the coccidiosis did not alter the bacterial community in the small intestine, although the ceca had higher level of *Bacteroides*. The hops β -acids have the potential to be used in the diets of broiler chickens, under low level of challenge, and to proliferation of *Clostridium*, although ineffective against *Eimeria*.

Keywords: Phytogetic additives; Coccidiosis; Microbial community; Intestinal health

1 INTRODUÇÃO

Os avanços obtidos nos plantéis avícolas devem-se, entre outros fatores, às melhorias no manejo sanitário das aves, em especial aos antimicrobianos melhoradores de desempenho utilizados nas rações. Diversos princípios ativos, quando utilizados em doses subterapêuticas, impedem a colonização e proliferação de patógenos no trato gastrointestinal, controlam doenças entéricas, e melhoram a eficiência alimentar e o desempenho zootécnico dos animais.

Entretanto, a União Europeia banuiu, a partir de janeiro de 2006, a utilização de qualquer antimicrobiano melhorador de desempenho na produção animal (CASTANON, 2007), sendo permitido o uso de antibióticos apenas para fins terapêuticos. Consequentemente, há uma pressão crescente para que outros países produtores de proteína animal, como o Brasil, sigam o modelo europeu e restrinjam a utilização de antimicrobianos.

Após o banimento destes aditivos pela UE, a utilização de ionóforos coccidiostáticos, que possui efeito contra espécies de *Eimeria* e algumas bactérias Gram-positivas, como *Clostridium perfringens*, tem aumentado gradativamente na produção de frangos de corte e, é vista como a única alternativa viável para o controle da enterite necrótica (ABILDGAARD et al., 2010). Entretanto, o uso de ionóforos como aditivos alimentares é questionado na UE e, por isso, existe a urgência em identificar alternativas viáveis que suprimam a proliferação de *Clostridium perfringens* e consequente produção de toxinas.

A máxima produtividade avícola tem relação direta com a microbiota intestinal e as associações que ocorrem entre esses micro-organismos e o hospedeiro. Essas interações contribuem para a manutenção da saúde, para a homeostase da população intestinal e para a integridade física do intestino do hospedeiro (PEDROSO, 2011). A primeira linha de defesa contra patógenos é a microbiota normal do intestino. Muitas bactérias comensais produzem ácidos orgânicos, incluindo os ácidos láctico, propiônico e butírico, bem como bacteriocinas que possuem efeito contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (OVIEDO-RONDÓN, 2009).

As infecções entéricas podem levar a uma série de prejuízos aos animais, alguns em parte decorrentes da alteração do equilíbrio da microbiota intestinal. A

coccidiose aviária, doença causada por protozoários do gênero *Eimeria*, além de causar danos físicos ao epitélio intestinal propicia a proliferação de patógenos, principalmente bactérias do gênero *Clostridium*, e, conseqüentemente, a diminuição do aproveitamento dos nutrientes pelo animal. Estudos têm demonstrado que a coccidiose causa drástica alteração do perfil de colonização microbiana do intestino (HUME et al., 2006; OVIEDO-RONDÓN et al., 2006) e este desequilíbrio da microbiota pode ser o responsável pelos prejuízos causados pela doença.

Prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos, enzimas e extratos vegetais são aditivos alternativos e eventuais substitutos dos antibióticos capazes de melhorar os índices produtivos dos animais, como consequência do controle das doenças entéricas subclínicas, modulação da microbiota intestinal ou modulação do sistema imune intestinal. Entretanto, nenhuma das alternativas têm sido tão eficientes quanto os antimicrobianos melhoradores de desempenho, e, em geral, têm mostrado resultados variáveis (NIEWOLD, 2007).

Alguns componentes do lúpulo (*Humulus lupulus*) constituem uma possibilidade de serem utilizados como aditivos nas rações de frangos, pelo seu efeito contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e de leveduras (MIZOBUCHI e SATO, 1985). O lúpulo e o extrato de suas flores são utilizados pela indústria cervejeira para conferir o sabor e aroma da cerveja, mas eles foram inicialmente utilizados para inibir o crescimento de bactérias ácido lácticas no processo de produção desta bebida (GRUESO et al., 2013).

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo na dieta de frangos de corte sobre o desempenho produtivo (experimento 1). Além disso, objetivou-se avaliar o efeito de dois níveis de β -ácidos, pré selecionados do experimento anterior, sobre o desempenho produtivo, bem como a capacidade dos β -ácidos em manter o equilíbrio da microbiota após desafio experimental com *Eimeria acervulina* e *E. tenella* (experimento 2).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da Microbiota Intestinal em frangos de corte

A microbiota intestinal constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, participando da regulação da permeabilidade celular, da expressão de genes de células caliciformes e da secreção de peptídeos antimicrobianos (LAPARRA; SANZ, 2010). Além disso, o adequado balanço do microbioma intestinal confere benefícios ao hospedeiro, pelo estímulo à produção de vitaminas, modulação imunológica e inibição de patógenos, enquanto o desequilíbrio microbiano pode contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas e imunológicas (JEURISSEN et al., 2002).

Nos últimos anos tem-se tornado freqüente a realização de pesquisas que objetivam determinar quais os principais fatores que alteram o equilíbrio da microbiota intestinal dos animais, haja vista a quantidade e a influência dos micro-organismos no trato gastrointestinal. Estima-se que a comunidade microbiana intestinal seja composta por mais de 800 espécies de bactérias, exercendo impacto significativo sobre o *status* nutricional e a saúde dos hospedeiros (LAPARRA; SANZ, 2010).

De acordo com Gabriel et al. (2006), em frangos de corte os principais locais do trato gastrointestinal com atividade bacteriana são o papo e os cecos. O intestino delgado possui menor quantidade de micro-organismos em virtude das condições desfavoráveis predominantes. No duodeno, por exemplo, ocorre elevada secreção de enzimas digestivas, alta pressão de oxigênio, alta concentração de componentes antimicrobianos (sais biliares), bem como constante movimentação do conteúdo alimentar a partir da moela e do jejuno, o que altera frequentemente as condições do ambiente duodenal. Por outro lado, na parte posterior do intestino delgado as condições tornam-se gradativamente mais favoráveis à proliferação microbiana, porém ainda com uma diversidade menor que o ceco. Neste local, o baixo turnover do conteúdo faz com que o número e a diversidade de micro-organismos elevem-se de maneira expressiva, com predominância de populações anaeróbias estritas.

Em frangos, a composição dietética e o ambiente externo afetam o *status* microbiano do trato gastrointestinal. Cama de aviário contaminada e outras condições de manejo afetam a composição da microbiota intestinal, tanto diretamente como fonte de bactérias, quanto indiretamente pela influência na barreira física e de defesa

do intestino (APAJALAHTI et al., 2004). Além disso, a flora luminal pode ser regulada pelo influxo de nutrientes a partir da dieta, pela taxa de passagem do conteúdo intestinal e nível e atividade de substâncias antimicrobianas (KAUTSOS; ARIAS, 2006). Laparra e Sanz (2010) também citaram que os componentes dietéticos com efeitos biológicos são metabolizados durante a passagem pelo trato intestinal, antes de serem absorvidos, servindo de substrato para diferentes populações microbianas, confirmando o fato de que os micro-organismos predominantes são determinados pela composição química da digesta.

Lu et al. (2003) afirmaram que antes de estudar como os antimicrobianos interferem na manutenção da saúde gastrointestinal dos animais, é necessário conhecer a microbiota intestinal de frangos alimentados com dietas vegetais simples. Por exemplo, estes autores observaram que em frangos alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, sem adição de proteína animal, antibióticos ou anticoccidianos, no íleo predominam bactérias do gênero *Lactobacillus*, seguido da família *Clostridiaceae*, gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*. Por outro lado, no ceco predomina a família *Clostridiaceae*, seguida dos gêneros *Fusobacterium*, *Lactobacillus* e *Bacteroides*. Além disso, a microbiota intestinal pode sofrer variação de acordo com a conversão alimentar dos frangos (STANLEY et al., 2012), ou, em sentido oposto, onde animais com melhor conversão alimentar podem servir como biomarcadores para manipulação e implante precoce da microbiota intestinal (PEDROSO et al., 2012).

O trato digestivo das aves pode alojar também diferentes espécies de bactérias patogênicas, tais como *Salmonella* e *Escherichia coli*. Bactérias Gram-negativas possuem na constituição da sua parede celular lipopolissacarídeos (endotoxinas) que são liberados durante a lise da célula bacteriana. Essas toxinas atuam no centro de termorregulação no hipotálamo. Outras toxinas podem afetar a motilidade intestinal, causando diarreias (GABRIEL et al., 2006). Através da exclusão competitiva a microbiota benéfica pode ligar-se a receptores das células intestinais e evitar que ocorra a ligação com patógenos, que serão eliminados pela excreta.

Apesar dos benefícios que a microbiota pode trazer ao hospedeiro, deve-se destacar que estes micro-organismos são consumidores de nutrientes e podem ser custosos ao animal (YANG et al., 2009). Os custos associados com estes benefícios podem incluir: competição com o hospedeiro por nutrientes, estímulo ao rápido turnover das células epiteliais absorptivas, secreção de componentes tóxicos e indução

de resposta inflamatória no trato gastrointestinal (YEGANI; KORVER, 2008). Assim, sabe-se que o adequado balanço microbiano intestinal é essencial não apenas para garantir a saúde do animal, mas também para evitar que os nutrientes dietéticos sejam utilizados de forma inapropriada.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que, na maioria das vezes, o aumento no número de *Lactobacillus* está associado com melhor saúde intestinal. Entretanto, Torok et al. (2011) verificaram que a presença de três espécies de *Lactobacillus* (*L. salivarius*, *L. aviarius* e *L. crispatus*) no íleo de frangos está potencialmente interligado com pior desempenho, o que pode elucidar os resultados obtidos por Peinado et al. (2013), onde com a diminuição do gênero *Lactobacillus*, houve melhor desempenho de frangos.

O *Lactobacillus salivarius* causa desconjugação de ácidos biliares no trato digestivo de frangos de corte, o que impede a emulsificação da gordura (GUBAN et al., 2006). Isso deve ser levado em consideração principalmente para frangos jovens que possuem menor capacidade de digestão e absorção de lipídeos (KNARREBORG et al., 2002a). Além disso, foi verificado que o *Clostridium perfringens* isolado do íleo de frangos também possui elevada capacidade de desconjugação de sais biliares (KNARREBORG et al., 2002b).

Portanto, o entendimento e monitoria do dinamismo do ecossistema microbiano intestinal são importantes para o desenvolvimento de alternativas ou produtos para modular a microbiota intestinal e melhorar o desempenho ou reduzir os fatores estressantes e controlar doenças entéricas (OVIEDO-RONDÓN, 2009). Este autor relatou que muitas pesquisas têm sido focadas no estudo das interações entre a nutrição e a microbiota cecal, mas que a comunidade microbiana do intestino delgado e papo (GABRIEL, 2006) também são importantes para a saúde e desempenho do hospedeiro.

Os antimicrobianos melhoradores de desempenho utilizados nas rações de frangos possuem importante função na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, evitando a proliferação excessiva de bactérias com potencial patogênico (BRISBIN et al., 2008). Os antimicrobianos reduzem a população microbiana do trato gastrointestinal, levando a maior disponibilidade de nutrientes para o hospedeiro e menor ativação da resposta inflamatória.

À semelhança dos antimicrobianos, os componentes bio-ativos extraídos de plantas podem controlar a proliferação excessiva de bactérias e a ocorrência de

doenças subclínicas. Diversas pesquisas demonstram o potencial de utilização dos aditivos fitogênicos nas dietas de frangos de corte para controle de patógenos intestinais e manutenção da microbiota benéfica (TIIHONEN et al., 2010; MOUNTZOURIS et al., 2011; ABDEL-WARETH et al., 2012; HASHEMI et al., 2012; KIM et al., 2013). Tiihonen et al. (2010) verificaram menor população de *Escherichia coli* e *Lactobacillus* no ceco de frangos suplementados com uma mistura de óleos essenciais, composto por timol e cinamaldeído, sendo que o aditivo também foi capaz de melhorar o ganho de peso.

Da mesma forma, Abildgaard et al. (2010) avaliaram uma mistura de timol, eugenol, curcumina e piperina na dieta de frangos de corte e verificaram que, aos 34 dias de idade das aves, houve redução na população de *Clostridium perfringens* no íleo e no ceco das aves, apesar de não haver diferença no desempenho. Por outro lado, Hashemi et al. (2012) verificaram que o extrato de *Euphorbia hirta*, planta de clima tropical rica em taninos, alcalóides e flavonóides, foi capaz de reduzir a população total de bactérias e de *Escherichia coli* no íleo de frangos. Esse resultado foi condizente com a melhora do desempenho das aves aos 42 dias de idade.

Por outro lado, Peinado et al. (2013) avaliaram o propil propano tiosulfato (PTS-O), composto derivado do alho que possui reconhecida atividade antimicrobiana (RUIZ et al., 2010; PEINADO et al., 2012), na dieta de frangos de corte e observaram menor número de lactobacilos no papo e aumento de bacteroides no papo e no íleo das aves. Além disso, houve aumento da energia metabolizável aparente das dietas com a inclusão do composto à base de alho (3448 vs 3321 cal/g), sem alteração na atividade de enzimas digestivas da borda em escova do intestino, o que sugere que a melhora da energia da dieta seja devida à diminuição de lactobacilos e aumento de bacteroides, ao invés do aumento da atividade enzimática.

Figura 1 - Fatores que afetam a microbiota intestinal

Desta forma, a dominância de micro-organismos benéficos sobre os prejudiciais da microbiota intestinal é essencial para saúde intestinal das aves e está diretamente relacionada à adequada absorção de nutrientes no intestino delgado, levando ao melhor desempenho do animal e menor incidência de doenças intestinais (Figura 1). Portanto, o objetivo em pesquisar-se a microbiota não deve ser apenas a caracterização ou mapeamento dos principais micro-organismos encontrados no trato gastrointestinal, mas sim entender a relação que existe entre os micro-organismos e o hospedeiro e a função que os micro-organismos podem exercer sobre a saúde do animal. Através disto, com a manipulação dietética, desenvolver estratégias capazes de manter o adequado balanço intestinal destes animais.

A comunidade intestinal é difícil de ser cultivada por diversas razões; algumas espécies de bactérias necessitam de condições nutricionais e atmosféricas para crescimento que não podem ser fornecidas pelos meios de cultura padronizados, pois as exigências das bactérias não são conhecidas (PEDROSO et al., 2012). Esses autores ainda relataram que algumas bactérias crescem facilmente na presença de

outras, pois os metabólitos produzidos por uma espécie beneficiam o crescimento de outra espécie; também, os meios de cultura geralmente são específicos para determinados grupos bacterianos.

Apesar das técnicas normais de cultivo limitarem o entedimento da microbiota intestinal (PEDROSO et al., 2012), o estudo da ecologia intestinal através de técnicas moleculares é, sem dúvida, eficiente para conhecer e entender o ecossistema intestinal. As alterações na microbiota de diferentes segmentos do trato digestório em função de ingredientes, aditivos, tipos de cama, idades e infecções foram avaliadas em trabalhos mais recentes usando as técnicas de PCR em tempo real (ABILDGAARD et al., 2010; TILLMAN et al., 2011), DGGE (PEDROSO; MENTEN; LAMBAIS, 2005; PEDROSO et al., 2006; ZHOU et al., 2007; CRESSMAN et al., 2010; OVIEDO-RONDON et al., 2010; LEE et al., 2010; LA-ONGKHUM et al., 2011) e T-RFLP (GONG et al., 2002; GEIER et al., 2010). As técnicas baseadas na similaridade do DNA ou RNA de genes selecionados na comunidade microbiana têm sido utilizadas com sucesso para caracterizar o ecossistema intestinal (PEDROSO, 2011).

2.2 Coccidiose aviária e aditivos fitogênicos: Desempenho e Microbiota Intestinal

A coccidiose aviária é uma doença intestinal causada por protozoários do gênero *Eimeria*, que afeta espécies de animais de maneira específica. *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. máxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. necatrix* e *E. tenella* possuem especificidade para a galinha doméstica, sendo incapazes de causar doença em outras espécies de aves. As características de produção da avicultura moderna, principalmente a elevada densidade no interior dos galpões, propicia ambiente favorável para o acúmulo de grande quantidade de parasitas, bem como a facilidade de transmissão entre os animais (SHIRLEY et al., 2007).

A coccidiose clínica com mortalidade elevada é menos comum. O que se observa com maior frequência são perdas econômicas ocasionadas pela infecção subclínica, ocorrendo piora na digestão e absorção de nutrientes, em virtude das lesões no trato gastrointestinal, e queda no desempenho. Desta forma, se o diagnóstico e o tratamento da doença não forem estabelecidos no período ideal, as perdas de desempenho podem ser acentuadas (KIPPER et al., 2013). De acordo com Allen e Fetterer (2002) a coccidiose é a doença parasitária de maior impacto econômico na indústria avícola.

O oocisto da *Eimeira* é altamente resistente à maioria dos princípios ativos utilizados na desinfecção dos galpões avícolas, por isso é difícil manter as aves livres de protozoários. Quando excretados pelas aves e em condições adequadas de temperatura e umidade os oocistos sofrem esporulação rapidamente (ALLEN; FERRETER, 2002). A infecção ocorre quando a aves ingerem oocistos esporulados, presentes na ração, na água ou na cama do aviário. Estes oocistos, quando ingeridos, sofrem ação mecânica da moela e posteriormente ação enzimática, ocorrendo a liberação de esporozoítos (ALLEN; FETTERER, 2002). De acordo com estes autores, o período pré-patente do parasita é de 4 a 5 dias, podendo ocorrer algumas variações, chegando ao máximo de 6 a 9 dias.

Uma vez no lúmen intestinal os esporozoítos invadem os enterócitos e se diferenciam em merozoítos através do processo chamado de merogonia. Merozoítos maduros reinfectam células vizinhas. O número de vezes que o parasita invade células vizinhas varia de dois a quatro, dependendo da espécie de *Eimeira*. Após a última geração de merozoítos, desenvolvem-se os macrogametócitos e os microgametócitos, que posteriormente formam os macrogametas e microgametas, respectivamente. A fertilização destes dois estágios do parasita gera o zigoto, que sai da célula do hospedeiro, maturando-se e formando um novo oocisto que inicia um novo ciclo de vida (YUN et al., 2000).

Devido ao fato de a *Eimeria* possuir ciclo de vida com estágio extracelular, intracelular, assexuada e sexuada a resposta imune contra este patógeno possui diferentes mecanismos (LILLEHOJ et al., 2004). Entre estes mecanismos tem-se a barreira epitelial mucosa, fagócitos e outros leucócitos, citocinas e componentes do sistema complemento (YUN et al., 2000). Todavia, o principal meio de controle da doença é através do uso de drogas anticoccidianas, associada com vacinas vivas atenuadas (VELKERS et al., 2010). Contudo, existe a expectativa que alguns componentes extraídos de plantas possam exercer efeitos similares às drogas anticoccidianas e desta forma auxiliar no controle desta doença.

Os aditivos fitogênicos constituem-se em misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (SIMÕES; SPITZER, 1999), cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, etc., em diferentes concentrações, nos quais um composto farmacologicamente ativo é majoritário. Eles possuem considerável

variação na composição química, dependendo das condições climáticas, fase de colheita, localização ou condições de armazenamento (APPLEGATE et al., 2010).

Por este motivo, Remmal et al. (2011) explanaram a necessidade pela pesquisa por aditivos que diminuam a possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana, além do menor potencial de deixar resíduos tóxicos nos produtos de origem animal. Estes autores investigaram o efeito anticoccidiano, *in vitro*, de 10 diferentes substâncias extraídas de plantas e verificaram que todas possuem ação contra os oocistos de *Eimeria*. Entretanto, eles observaram que os óleos essenciais mais eficientes foram da *Artemisia absinthium*, *Tea tree*, *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Syzygium aromaticum* (óleo de cravo), os quais reduziram a quantidade de oocistos em proporção mais significativa que a salinomicina.

Por outro lado, estudos têm avaliado o efeito *in vivo* de extratos de plantas como aditivo para o controle da coccidiose, e, na maioria das vezes os compostos bio-ativos extraídos de plantas mostraram efeito benéfico contra o protozoário (ALLEN et al., 1997; GIANNENAS et al., 2003; NAIDOO et al., 2008; LEE et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; KIM et al., 2013). *Artemisia annua* (ALLEN et al., 1997) e óleo essencial de orégano (GIANNENAS et al., 2003) promoveram significativa proteção contra *Eimeria tenella*. *Tulbaghia violacea* diminuiu a excreção de oocistos nas fezes dos frangos e preveniu a piora no desempenho (NAIDOO et al., 2008). Além disso, Lee et al. (2011) obtiveram melhor desempenho e melhor resposta imune de frangos desafiados com *E. tenella* e suplementados com duas misturas de fitonutrientes.

Componentes que possuem a capacidade de gerar estresse oxidativo no parasita, como, por exemplo, a artemisina (extraída da *Artemisia annua*), são particularmente efetivos contra *E. tenella*. Por outro lado, se a substância possui efeito antioxidante, como é o caso da curcumina, o principal efeito será contra *E. acervulina* e *E. maxima* (ALLEN; FERRETER, 2002).

A maioria das pesquisas utiliza alguma forma de desafio com oocistos para estudar o efeito destes aditivos fitogênicos, sendo que a intensidade e severidade do desafio podem variar de acordo com a espécie de *Eimeira* utilizada. Por exemplo, Kapper et al. (2013) realizaram uma meta-análise para avaliar as variações no desempenho produtivo que ocorreram em frangos desafiados com diferentes espécies de *Eimeira* e observaram que de maneira geral o consumo de ração não foi alterado com desafio de *E. acervulina* e *E. tenella*. Entretanto, ocorreu aumento de

consumo de ração na presença de *E. maxima* e diminuição de até 23% no ganho de peso, o que resultou em piora de até 140% na conversão alimentar.

Quando uma infecção causa redução de mais de 20% no consumo de ração, a *E. acervulina* tende a prejudicar o ganho de peso de forma mais intensa, quando comparada com as outras espécies de *Eimeria*. Isso ocorre pelo fato de a *E. acervulina* afetar o duodeno, que possui grande influência na digestão e absorção dos nutrientes. Por outro lado, se não ocorrer alteração no consumo de ração a *E. maxima* causa maior alteração no ganho de peso, comparada às outras espécies de *Eimeria* (KAPPER et al., 2013). A *E. tenella*, que infecta basicamente os cecos das aves, possui pouco efeito nutricional e com pequena duração, mas com sinais clínicos severos e mortalidade elevada, que ocorrem usualmente depois do quinto dia de infecção. Por exemplo, a *E. maxima* causa o dobro de redução no ganho de peso em comparação a *E. tenella*, caso o consumo de ração permaneça constante (KAPPER et al., 2013; KIM et al., 2013)

Doenças entéricas causam prejuízo na indústria avícola, pois ocasionam perda de produtividade, aumento da mortalidade, reduzem o bem estar das aves e são associadas com contaminação dos produtos destinados ao consumo humano (DAHIYA et al., 2006). Em situações rotineiras, a coccidiose aviária pode desencadear nas aves uma reação na qual as células caliciformes do intestino aumentam a produção de muco. Isso levaria a um ambiente de anaerobiose em determinadas regiões do intestino e necrose poderia ocorrer dependendo do grau de infecção. Esses fatores são determinantes para a proliferação de micro-organismos anaeróbicos patogênicos, como o *Clostridium perfringens* (BABA et al., 1997), que causa acentuada redução no desempenho de frangos (MIKKELSEN et al., 2009). Além disso, as lesões intestinais causadas pela *Eimeria* podem aumentar a disponibilidade de substrato para bactérias patogênicas, ocorrendo desequilíbrio microbiano (PEDROSO et al., 2012).

Normalmente a população de *C. perfringens* é baixa no intestino, mas a alteração da microflora normal pode causar rápida proliferação desta bactéria, levando ao desenvolvimento de enterite necrótica (EN) (DAHIYA et al., 2006). Os mesmos autores explanaram que a EN é uma doença multifatorial e que um determinado número de co-fatores são necessários para a ocorrência de surto da doença. Eles também afirmaram que apesar de resultados experimentais contraditórios, os principais fatores predisponentes para EN em frangos de corte, são:

infecção com *Eimeria*, remoção de coccidiostáticos e antimicrobianos melhoradores de desempenho das dietas, condições de ambiente e manejo precárias, estresse fisiológico e imunossupressão, além da forma e a natureza da dieta.

Além de causar enterite e diarreia, a coccidiose está frequentemente associada à diminuição na absorção de nutrientes e queda no desempenho das aves (CHAPMAN et al., 2010). Em casos de infecção, todo o intestino pode ficar comprometido, pois as diferentes espécies de *Eimeria* possuem afinidade pelas diferentes porções do órgão. Estudos têm demonstrado que a coccidiose causa drástica alteração do perfil de colonização microbiana do intestino (HUME et al., 2006; OVIEDO-RONDÓN et al., 2006) e esse desequilíbrio da microbiota pode ser o responsável pelos prejuízos causados pela doença.

Por exemplo, Oviedo-Rondon et al. (2006) mostraram que a coccidiose causa alteração de até 45 e 64% no perfil de colonização microbiana do íleo e ceco, respectivamente. Entretanto, quando as aves receberam dietas suplementadas com uma mistura de óleos essenciais, essa alteração foi de apenas 19 e 32%. Isso evidencia o potencial dos componentes de plantas como substitutos dos antimicrobianos melhoradores de desempenho nas dietas e frangos de corte.

2.3 Extrato de Lúpulo e possível uso como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho em dietas de frangos de corte

O lúpulo e o extrato de suas flores são utilizados pela indústria cervejeira para conferir o sabor e o aroma da cerveja. Entretanto, esses produtos foram inicialmente utilizados para inibir o crescimento de bactérias ácido lácticas no processo de produção desta bebida (GRUESO et al., 2013).

As principais substâncias encontradas no lúpulo são os α -ácidos e os β -ácidos. Em conjunto com estes, outros compostos estruturalmente semelhantes estão presentes naturalmente ou são formados durante a secagem e armazenamento da planta (BIENDL; PINZL, 2008). Os principais componentes dos α -ácidos são o humulone e isohumulone, responsáveis pelo sabor amargo da cerveja. Os β -ácidos (lupulone e seus congêneres) possuem sabor menos amargo e conferem maior atividade antimicrobiana, sendo o lupulone o componente majoritário desta fração (SIRAGUSA et al., 2008).

Os β -ácidos possuem forte atividade antimicrobiana devido à sua natureza hidrofóbica, que facilita a interação com membranas de células bacterianas, especialmente Gram-positivas. Nessa linha, os β -ácidos atuam como ionóforos contra bactérias Gram-positivas (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. e *Bacillus* spp.) inibindo ou reduzindo o crescimento (SIRAGUSA et al., 2008).

Na indústria cervejeira os β -ácidos são utilizados em dornas de fermentação para inibir o crescimento de *Lactobacillus*, sem afetar a atividade das leveduras (VAN CLEEMPUT et al., 2009). Esse efeito antimicrobiano é atribuído aos grupos prenil existentes na estrutura dos α - e β -ácidos (Figura 2). Os β -ácidos têm mostrado maior atividade antimicrobiana, pois possuem três grupos prenil em sua estrutura, enquanto os α -ácidos possuem apenas dois (CHIN; ANDERSON, 1949; MICHENER et al., 1949; ALMEIDA et al., 2012))

Figura 2 - (A): estrutura dos α -ácidos e (B): estrutura dos β -ácidos

Existem poucas informações sobre a eficácia do uso de β -ácidos na dieta de animais na melhora do desempenho produtivo, embora resultados de pesquisas apontem os constituintes do lúpulo como possíveis substitutos dos antimicrobianos melhoradores de desempenho nas dietas de frangos de corte (CORNELISON et al., 2006; SIRAGUSA et al., 2008; TILLMAN et al., 2011). Cornelison et al. (2006) compararam o efeito de promotor de crescimento da penicilina com o extrato do lúpulo e verificaram que na dosagem de 227 mg/kgdo extrato o peso vivo dos frangos aos 42 dias foi estatisticamente semelhante ao das aves que receberam penicilina. Por outro lado, Bozkurt et al. (2009) observaram maior peso vivo aos 21 dias de frangos suplementados com extrato de lúpulo quando comparado às aves que receberam avilamicina.

Siragusa et al. (2008) observaram que o extrato de lúpulo na água de bebida reduziu a contagem de *Clostridium perfringens* no jejuno e nos cecos de frangos de corte. Da mesma forma, Tillman et al. (2011), com auxílio da PCR em tempo real, observaram menor quantidade de *Clostridium perfringens* no intestino delgado e nos cecos das aves que receberam lupulone, evidenciando o possível efeito antimicrobiano deste β -ácido.

Objetivo

Foram desenvolvidos dois experimentos com finalidades específicas.

- No primeiro, avaliou-se o efeito de níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo sobre o desempenho produtivo de frangos de corte.
- No segundo ensaio, utilizando-se dois níveis selecionados a partir do primeiro, objetivou-se avaliar o desempenho produtivo, bem como a capacidade dos β -ácidos do lúpulo em manter o equilíbrio da microbiota intestinal de frangos de corte desafiados com *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Experimento 1

3.1.1 Experimento de Campo

O experimento foi realizado no Biotério de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, no período de 19 de junho a 31 de julho de 2012. (Figura 3).

Figura 3 - A: aviário experimental; B: unidade experimental

Foram alojados 1440 pintinhos machos, da linhagem Cobb 500, no período experimental de 1 a 42 dias de idade, em um delineamento inteiramente aleatorizado. As aves foram divididas em 6 tratamentos e 6 repetições/tratamento, totalizando 36 parcelas de 40 aves cada. As aves foram inicialmente separadas por faixas de peso, em seguida distribuídas entre os boxes, de forma que o peso das unidades experimentais fosse o mais homogêneo possível.

Os boxes, contendo 10 cm de cama reutilizada, foram forrados com papel durante os três primeiros dias de alojamento, sendo que cada boxe esteve provido de lâmpada infravermelha para aquecimento, bebedouro e comedouro infantil. O bebedouro infantil foi substituído por bebedouro pendular no terceiro dia de alojamento e o comedouro infantil substituído pelo adulto ao sétimo dia de alojamento.

O programa nutricional foi composto por quatro dietas experimentais, destinadas às diferentes fases de criação das aves: pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (7 a 21 dias de idade), crescimento (21 a 35 dias de idade) e final (35 a 42 dias de idade) (Tabela 1). As rações foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental, na forma farelada. As dietas foram formuladas à base de milho e farelo de soja, conforme níveis nutricionais recomendados pelas Tabelas Brasileiras (ROSTAGNO et al., 2011). Com o objetivo de impor desafio sanitário às aves, foi incluída na formulação farinha de penas e vísceras de aves (possivelmente contaminadas, isto é, sem tratamento prévio) ao nível de 5% como ingrediente nas rações experimentais de todas as fases (Tabela 1). Além disso, também foi utilizado farelo de trigo com inclusão de 5% nas dietas experimentais para acentuar o desafio experimental, uma vez que o ingrediente pode provocar aumento da viscosidade do conteúdo intestinal das aves pelo maior conteúdo de fibra. A composição de todos os ingredientes usados na formulação das rações foi retirada das Tabelas Brasileiras (ROSTAGNO et al., 2011).

Os tratamentos experimentais utilizados foram:

- T1: Controle negativo (CN): Ração não suplementada com antimicrobiano;
- T2: Controle Positivo (CP): Ração suplementada com Bacitracina de zinco, 30 mg/kg;
- T3: Controle negativo + de 30 mg/kg de β -ácidos do lúpulo;
- T4: Controle negativo + de 60 mg/kg de β -ácidos do lúpulo;
- T5: Controle negativo + de 120 mg/kg de β -ácidos do lúpulo;
- T6: Controle negativo + de 240 mg/kg de β -ácidos do lúpulo;

O produto utilizado contendo o β -ácido possui concentração de 30%, ou seja, para obter a dosagem de β -ácido especificado utilizou-se 100, 200, 400 e 800 mg/kg do produto para os tratamentos 3, 4, 5 e 6, respectivamente. As concentrações totais de β -ácido detectado nas dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 2. Verifica-se que praticamente todo o β -ácido adicionado na ração foi recuperado após a mistura, ou seja, a metodologia empregada para desenvolver o produto microencapsulado apto a ser incluído na ração dos animais é eficaz para manter a integridade do composto, o que garante o consumo do β -ácido pela ave.

Tabela 1 - Composição das rações experimentais (Experimento 1)

Ingredientes, %	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho	50,90	56,50	60,00	62,95
Farelo de soja	32,87	28,00	24,12	21,42
Farelo de trigo	5,0	5,0	5,0	5,0
Far. de penas e vísceras	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de soja	2,29	2,01	2,84	2,98
Fosfato bicálcico	1,61	1,23	1,00	0,78
Calcário calcítico	0,79	0,80	0,74	0,64
Sal comum	0,47	0,44	0,42	0,40
MHA ¹	0,450	0,365	0,330	0,290
L-Lisina HCl	0,322	0,294	0,290	0,285
L-Treonina	0,071	0,042	0,031	0,021
Suplemento vitamínico ²	0,100	0,100	0,080	0,060
Suplemento mineral ³	0,05	0,05	0,05	0,05
Cloreto de Colina (60%)	0,08	0,08	0,06	0,04
Inerte	0,08	0,08	0,08	0,08
Total (kg)	100	100	100	100
Composição calculada				
EMAn (kcal/kg)	2950	3000	3100	3150
Poteína Bruta (%)	23,30	21,50	20,00	19,00
Lisina digestível. (%)	1,310	1,174	1,078	1,010
Met.+cistina digestível (%)	0,944	0,846	0,787	0,737
Metionina digestível (%)	0,620	0,542	0,501	0,463
Treonina digestível (%)	0,852	0,763	0,701	0,656
Cálcio (%)	0,920	0,819	0,732	0,638
Fósforo disponível (%)	0,470	0,391	0,342	0,298
Potássio (%)	0,818	0,745	0,684	0,643
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195

¹Metionina hidroxi-análoga²DSM Nutritional Products, Composição por kg de produto: Vit, A – 9.000000 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 mg³DSM Nutritional Products, Composição por kg de produto: Manganês - 160000 mg; Ferro - 100000 mg; Zinco - 100000 mg; Cobre - 20000 mg; Cobalto - 2000 mg; Iodo - 2000 mgTabela 2 -Teor total de β -ácidos (mg/kg) nas rações experimentais

Tratamentos	Fase experimental		
	Pré-inicial	Inicial	Crescimento
Controle negativo (CN)	ND*	ND*	ND*
Controle positivo (CP)	NA*	NA*	NA*
CN+30 mg/kg β -ácidos	22,8	23,4	22,2
CN+60 mg/kg β -ácidos	63,1	51,3	54,5
CN+120 mg/kg β -ácidos	114	122	111
CN+240 mg/kg β -ácidos	212	224	216

*ND: não detectado; NA: não analisado

Por outro lado, o produto comercial contendo a bacitracina de zinco possui concentração de 15% do princípio ativo, ou seja, utilizou-se dosagem de 200 mg/kg do produto em todas as fases. Ambos foram utilizados em substituição ao inerte. As rações não foram suplementadas com agentes anticoccidianos.

Além do desafio experimental provocado pelo ingrediente de origem animal e pelo farelo de trigo utilizados na dieta, aos 7 dias de idade, todas as aves foram vacinadas por via ocular com uma vacina contra coccidiose (Bio-Coccivet R/Biovet) contendo oocistos esporulados vivos atenuados das seguintes espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*; *E. brunetti*; *E. maxima*; *E. necatrix*; *E. praecox*; *E. tenella* e *E. mitis*, na dosagem recomendada pelo laboratório. Essa vacinação foi feita com o propósito de provocar um stress imunológico adicional aos pintinhos, além de propiciar condições favoráveis à proliferação de bactérias do gênero *Clostridium*.

As aves e a sobra das rações fornecidas foram pesadas semanalmente (7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) para determinação das variáveis de desempenho, peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e viabilidade criatória (VB) dos animais. A conversão alimentar foi corrigida para mortalidade e calculada conforme Sakomura e Rostagno (2007). Ao final do período experimental (42 dias) calculou-se o Índice de Eficiência Produtiva (IEP) das aves, através da fórmula: $IEP = GMD(g) \times VB(\%) / CA \times 10$, onde GMD é o ganho médio diário, VB a viabilidade e CA a conversão alimentar.

3.1.2 Análise estatística

Foi verificada a normalidade dos resíduos dos dados e a homogeneidade de suas variâncias. Posteriormente, os dados de desempenho foram submetidos a análise de variância a 5% de probabilidade, e em caso de significância as médias foram comparadas pelo teste de Duncan utilizando-se o PROC GLM do SAS (9.3).

3.2 Experimento 2

3.2.1 Experimento de campo

O experimento foi realizado no Biotério de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, no período de 31 de janeiro a 14 de março de 2013.

Foram alojados 1440 pintinhos machos, da linhagem Ross, no período experimental de 1 a 42 dias de idade, em um delineamento inteiramente aleatorizado. As aves foram divididas em 6 tratamentos e 6 repetições/tratamento, totalizando 36 parcelas de 40 aves cada. As aves foram inicialmente separadas por faixas de peso, em seguida distribuídas entre os boxes, de forma que o peso das unidades experimentais fosse o mais homogêneo possível.

Os boxes, contendo 10 cm de cama reutilizada, foram forrados com papel durante os três primeiros dias de alojamento, sendo que cada boxe esteve provido de lâmpada infravermelha para aquecimento, bebedouro e comedouro infantil. O bebedouro infantil foi substituído por bebedouro pendular no terceiro dia de alojamento e o comedouro infantil substituído pelo adulto ao sétimo dia de alojamento.

O programa nutricional foi composto por quatro dietas experimentais, destinadas às diferentes fases de criação das aves: pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (7 a 21 dias de idade), crescimento (21 a 35 dias de idade) e final (35 a 42 dias de idade) (Tabela 3). As rações foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental, na forma farelada. As dietas foram formuladas à base de milho e farelo de soja, conforme níveis nutricionais recomendados pelas Tabelas Brasileiras (ROSTAGNO et al., 2011). Realizou-se a inclusão de 5% de farinha de penas e vísceras possivelmente contaminadas, isto é, sem tratamento prévio, com o objetivo de impor maior desafio sanitário às aves, haja vista a possibilidade de contaminação com enterobactérias e *Clostridium perfringens*.

Os tratamentos experimentais utilizados foram:

- T1: Controle negativo, aves não desafiadas e ração sem antimicrobiano;
- T2: Controle positivo, aves não desafiadas e ração com 30 mg/kg de bacitracina de zinco;

- T3: aves desafiadas e ração sem antimicrobiano;
- T4: aves desafiadas e ração com 30 mg/kg de bacitracina de zinco;
- T5: aves desafiadas e ração com 30 mg/kg de β -ácidos de lúpulo;
- T6: aves desafiadas e ração com 240 mg/kg de β -ácidos de lúpulo.

As dosagens de β -ácidos utilizadas foram selecionadas em virtude dos resultados obtidos no experimento anterior, em que com a dosagem mais baixa (30 mg/kg) obteve-se o melhor resultado de desempenho produtivo. Por outro lado, o nível mais alto (240 mg/kg) foi escolhido pela possibilidade do β -ácido se mais efetivo em situação de desafio sanitário elevado.

O produto utilizado contendo os β -ácidos na forma microencapsulada, continha 30% do princípio ativo, ou seja, para obtenção das dosagens especificadas utilizaram-se as concentrações de 100 e 800 mg/kg de produto, para os tratamentos 5 e 6, respectivamente. Por outro lado, o produto comercial contendo a bacitracina de zinco possui concentração de 15% do princípio ativo, ou seja, utilizou-se dosagem de 200 mg/kg do produto em todas as fases. Ambos foram utilizados em substituição ao inerte. As rações não foram suplementadas com agentes anticoccidianos.

Aos 14 dias de idade realizou-se a inoculação de oocistos vivos esporulados de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*, na dosagem de 2×10^5 e 5×10^4 oocistos/ave, respectivamente, individualmente e por via oral (Figura 4), com o objetivo de causar desequilíbrio da microbiota intestinal. A inoculação foi realizada nos tratamentos 3, 4, 5 e 6. Desta forma, até os 14 dias de idade das aves o experimento continha apenas 4 tratamentos, ou seja, o controle negativo e positivo (com 12 repetições cada), mais os dois tratamentos com adição de β -ácido.

Aos 7 e 21 dias após o desafio experimental, isto é, 21 e 35 dias de vida das aves, três aves por parcela (sendo três repetições por tratamento a cada coleta), foram selecionadas sem jejum prévio, sacrificadas por deslocamento cervical e o trato gastrointestinal foi exposto. O intestino delgado e ceco das aves foram retirados e imediatamente congelados (Figura 5). Posteriormente, as amostras foram descongeladas e, em seguida, foram feitos “pools” do conteúdo do intestino delgado e do ceco das três aves de cada unidade experimental. As amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e novamente congeladas a -20°C para posterior análise da composição microbiana.

Tabela 3 - Composição das rações experimentais (Experimento 2)

Ingredientes, %	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho	54,65	59,60	61,78	65,82
Farelo de soja	34,90	29,86	27,06	23,44
Far. de penas e vísceras	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de soja	1,48	1,91	2,96	2,91
Fosfato bicálcico	1,58	1,31	1,08	0,87
Calcário calcítico	0,81	0,81	0,75	0,66
Sal comum	0,47	0,44	0,42	0,40
MHA ¹	0,44	0,40	0,36	0,33
L-Lisina HCl	0,29	0,31	0,29	0,31
L-Treonina	0,06	0,05	0,03	0,03
Suplemento vitamínico ²	0,10	0,10	0,08	0,06
Suplemento mineral ³	0,05	0,05	0,05	0,05
Cloreto de Colina (60%)	0,08	0,08	0,06	0,04
Inerte	0,08	0,08	0,08	0,08
Total (kg)	100	100	100	100
Composição calculada				
EMAn(kcal/kg)	2960	3050	3150	3200
Poteína Bruta (%)	23,70	21,90	20,80	19,50
Lisina digestível. (%)	1,324	1,217	1,131	1,060
Met.+cistina digestível. (%)	0,953	0,876	0,826	0,774
Metionina digestível(%)	0,624	0,570	0,533	0,496
Treonina digestível (%)	0,861	0,791	0,735	0,689
Cálcio (%)	0,920	0,841	0,758	0,663
Fósforo disponível (%)	0,470	0,401	0,354	0,309
Potássio (%)	0,815	0,737	0,692	0,637
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195

¹Metionina hidroxí-análoga²DSM Nutritional Products, Composição por kg de produto: Vit, A – 9.000000 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 mg³DSM 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

Figura 4 - Inoculação de oocistos esporulados de *Eimeria* spp. em frangos de corte com 14 dias de idade

Figura 5 - Coleta e armazenamento do trato gastrointestinal

As aves e a sobra das rações fornecidas foram pesadas semanalmente (7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) para determinação das variáveis de desempenho, peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e viabilidade criatória (VB) dos animais. A conversão alimentar foi corrigida para mortalidade e calculada conforme Sakomura e Rostagno (2007).

Após o desafio experimental, foram adotadas medidas de biossegurança para evitar a disseminação de oocistos de *Eimeria* dos boxes desafiados para os não desafiados. Por exemplo, o manejo diário era realizado primeiramente nos boxes sem

desafio e posteriormente nos demais. Caso no decorrer do dia fosse necessário entrar nos boxes desafiados, utilizaram-se botas descartáveis de plástico. No final do dia e no início da manhã passava-se lança chamas no corredor do aviário, pelo fato de os oocistos serem sensíveis ao calor seco.

3.2.2 Análise estatística

Foi verificada a normalidade dos resíduos dos dados e a homogeneidade de suas variâncias. Posteriormente, os dados de desempenho foram submetidos a análise de variância a 5% de probabilidade e em caso de significância as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, utilizando o PROC GLM do SAS (9.3).

3.2.3 Análise da microbiota intestinal

3.2.3.1 Preparo do pélete bacteriano.

Para análise da microbiota do conteúdo do intestino delgado, primeiramente realizou-se a concentração da fração bacteriana das amostras, de acordo com metodologia (adaptada) proposta por Apajalahti et al. (1998). O protocolo utilizado foi o seguinte: em uma seringa estéril de 60 mL foi construída uma coluna, composta de papel filtro, na parte inferior, algodão estéril na porção intermediária, e duas gases na porção superior (Figura 6). Essa coluna foi colocada em uma garrafa autoclavada de centrífuga refrigerada. Posteriormente, foram diluídos 15 g de conteúdo intestinal, previamente homogeneizado, em 50 mL de SPB (buffer de fosfato de sódio pH 8) 50mM, contendo 0,1% de Tween 80. A solução foi vagarosamente homogeneizada e o conteúdo adicionado na coluna para ser filtrado.

A garrafa contendo a coluna com a amostra foi centrifugada a 4500 rpm por 20 minutos, a 4°C (Figura 7). Esta coluna funcionou como um filtro, onde ficaram retidas as impurezas da amostra, conteúdo intestinal e 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 endorpes de 1,5 mL, no volume máximo de 200 µL por tubo. Os tubos foram

novamente centrifugados a 7500 rpm por 10 minutos. Novamente as bactérias concentraram-se no fundo e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado.

Figura 6 - Coluna elaborada para filtrar o conteúdo intestinal

Figura 7 - (A): Colunas aptas à serem centrifugadas e, (B): Colunas após centrifugação.

O pélete bacteriano restante foi pesado e ressuspenso 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.

O procedimento descrito foi realizado com o objetivo de concentrar as bactérias do conteúdo do intestino delgado. Por outro lado, o conteúdo cecal, com maior concentração de micro-organismos, foi apenas diluído em Solução Peptone na proporção de 1:10.

3.2.3.2 Extração do DNA das amostras do conteúdo intestinal

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. Pipetou-se 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, pois o pélete com as bactérias ficou aderido no fundo do eppendorf.

Para a lise da célula bacteriana, o pélete foi diluído e adicionado na 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. A mistura foi agitada em vortex por 40 minutos (Adaptador para vortex, Mo Bio). Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 100 rpm por 30 segundos. O líquido foi então transferido para outro eppendorf, no qual foi adicionado 25 µL de solução SDS (10%) e 2,5 µL de proteinase K. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos e após 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, adicionou-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 concentrou-se no fundo do eppendorf, foi lavado com álcool etílico 70 e 100%, respectivamente, totalizando duas lavagens. Ao final do processo, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de água molecular (Nuclease Free Water), armazenado overnight a 4°C para hidratar e posteriormente congelado a -20°C.

3.2.3.3 Amplificação e Sequenciamento do 16S rDNA bacteriano

O DNA previamente extraído foi amplificado via PCR na região V4 do gene 16S rDNA depois da desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos, de desnaturação a 95° C por 45 segundos, anelamento a 57° C por 1 minuto e 45 segundos e extensão a 72° C por 60 segundos. A extensão final foi conduzida por

72° C por 4 minutos. Os primers bacterianos utilizados foram: Forward “AYTGGGYDTAAAGNG” (*E. coli* position 563-577) e reverse “CCGTCAATTCMTTTRAGT” (*E. coli* 907-924). Além disso, utilizou-se 10X PCR Buffer; Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$ – 50mM); dNTP’s (10mM) e a Taq Polimerase na concentração de 5U/ μ L. Após este primeiro PCR, o produto da reação foi purificado com o Kit Charge Switch, de acordo com instruções do fabricante. 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 5 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos e 72 °C por 5 minutos. O produto foi mantido a -20° C até o momento do sequenciamento. Nesta última reação foi usado 5 μ L de cada adaptador (2 adaptadores para cada amostra), mais 15 μ L do produto da primeira PCR. 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.

Realizou-se Teste de Qui-quadrado para comparação das frequências dos gêneros bacterianos presentes, adotando-se o nível de significância de 5%. As comparações entre tratamentos realizadas para estudar o comportamento da frequência do DNA bacteriano foram as seguintes: Controle negativo vs Controle positivo; Controle negativo vs Controle negativo + desafio; Controle positivo vs Controle positivo + desafio; Controle positivo vs Controle negativo + desafio; Controle positivo + desafio vs 30 mg/kg de β -ácidos + desafio; Controle positivo + desafio vs 240 mg/kg de β -ácidos + desafio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1

O uso profilático de antimicrobianos na produção de frangos para melhorar o desempenho é bem conhecido. Entretanto, devido à preocupação de transmissão e proliferação de bactérias resistentes houve progressiva restrição ao uso de diversos produtos em muitos países, culminado com o banimento do uso destas substâncias na União Européia desde 2006. Como resultado, novos aditivos comerciais derivados de plantas têm sido pesquisados como parte de estratégias alternativas para o futuro (BRENES; ROURA, 2010).

Todas as plantas produzem compostos químicos como parte de suas atividades metabólicas normais. Essas substâncias são classificadas como metabólitos primários, como açúcares e gorduras, e metabólitos secundários, ou fitoquímicos. Cada planta contém diferentes substâncias biológicas, que produzem efeitos diversos devido aos diferentes mecanismos de ação. O mais importante mecanismo de aditivos fitogênicos está relacionado com o efeito benéfico que essas substâncias possuem sobre a microflora intestinal, controlando potenciais patógenos (HASHEMI; DAVOODI, 2011).

No período de 1 a 7 dias, não houve efeito dos tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 4). Foi observado, entretanto, uma tendência de redução do consumo de ração com os maiores níveis de β -ácidos utilizados ($P=0,06$). Os resultados do desempenho produtivo aos 21 dias de idade são mostrados na Tabela 4. Observa-se que houve efeito dos tratamentos para todas as variáveis ($P<0,05$). Os tratamentos com promotor de crescimento ou com até 60 mg/kg de β -ácidos não afetaram o peso vivo e o ganho de peso. Entretanto, os β -ácidos causaram redução no consumo de ração com o maior nível utilizado (240 mg/kg) o que levou à diminuição no ganho de peso. O consumo de ração foi reduzido e a conversão alimentar foi melhorada para todos os tratamentos em relação ao controle negativo. A melhor conversão alimentar foi obtida com a bacitracina de zinco (1,472), a qual não diferiu da conversão obtida com os níveis mais baixos de β -ácidos (1,498 e 1,490). Além disso, todos os níveis de β -ácidos resultaram em melhor conversão alimentar, comparados ao controle negativo.

Seguindo as pesquisas com aditivos fitogênicos, Barreto et al. (2008) não verificaram diferenças no desempenho produtivo aos 21 dias de frangos de corte suplementados com diferentes componentes bio-ativos extraídos de plantas (extratos de orégano, alho, canela e pimenta vermelha). Por outro lado, Bozkurt et al. (2009) verificaram melhor peso vivo e conversão alimentar em frangos alimentados com dietas contendo lúpulo em comparação àqueles do tratamento com avilamicina. Da mesma forma, Rizzo et al. (2010) observaram melhor conversão alimentar aos 21 dias de idade de frangos alimentados com extratos vegetais (cravo, tomilho, canela e pimenta), em comparação às aves que receberam antibiótico (avilamicina).

Tabela 4 - Desempenho produtivo de frangos de corte aos 7, 21 e 35 dias suplementados com níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo

Tratamentos	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA
	1-7 dias			
Controle negativo	191	149	169	1,133
Controle positivo	192	150	169	1,126
CN+30 mg/kg	191	148	171	1,153
CN+60 mg/kg	192	150	167	1,113
CN+120 mg/kg	189	146	165	1,126
CN+240 mg/kg	189	150	165	1,124
CV(%)	2,08	2,70	2,36	2,37
Valor de P	NS	NS	0,06	NS
Tratamentos	1-21 dias			
	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA
Controle negativo	944 a	905 a	1430 a	1,580 a
Controle positivo	958 a	916 a	1348 bc	1,472 c
CN+30 mg/kg	950 a	910 a	1364 b	1,498 bc
CN+60 mg/kg	959 a	922 a	1373 b	1,490 bc
CN+120 mg/kg	928 ab	893 ab	1353bc	1,514 b
CN+240 mg/kg	904 b	866 b	1312 c	1,514 b
CV(%)	2,84	3,05	2,79	1,65
Valor de P	0,01	0,02	0,001	<0,0001
Tratamentos	1-35 dias			
	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA
Controle negativo	2295	2255	3855	1,709 a
Controle positivo	2332	2289	3781	1,657 b
CN+30 mg/kg	2337	2297	3792	1,650 b
CN+60 mg/kg	2328	2291	3797	1,657 b
CN+120 mg/kg	2284	2250	3760	1,671 b
CN+240 mg/kg	2298	2260	3751	1,659 b
CV(%)	2,13	2,18	2,13	1,23
Valor de P	NS	NS	NS	0,006

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CN: controle negativo; CP: Controle Positivo; CV: coeficiente de variação

Um dos principais problemas encontrados na avaliação de aditivos melhoradores de desempenho em condições experimentais são as boas condições de instalações e manejo em que as aves são criadas. Por isso, Fukayama et al. (2005) e Karimi et al. (2010) sugeriram que os experimentos sejam realizados com desafio sanitário apropriado, simulando condições de campo, para que os extratos de plantas expressem seu possível potencial de melhorador de desempenho. Pesquisas que objetivam avaliar aditivos em substituição aos antimicrobianos melhoradores de desempenho devem adotar medidas que propiciem a proliferação de micro-organismos causadores de doenças entéricas. Dahiya et al. (2006) apontaram que infecções com *Eimeria* sp., remoção de coccidiostáticos ou antimicrobianos, estresse imunológico e a natureza e a forma da dieta são fatores que podem desequilibrar a microbiota intestinal das aves, principalmente na fase inicial. Desta forma, optamos pela inclusão de ingrediente de origem animal possivelmente contaminado e farelo de trigo nas dietas, além da vacinação contra *Eimeria* sp., como medidas para impor maior desafio sanitário às aves. A manipulação da composição da dieta é justificada, pois, de acordo com Bona et al. (2012), dietas compostas por ingredientes de boa qualidade reduzem o substrato disponível para bactérias ao longo do trato intestinal, mascarando o potencial efeito antimicrobiano dos compostos vegetais.

Na Tabela 4, também estão apresentados os resultados de desempenho produtivo dos frangos aos 35 dias de idade. Aos 35 dias de idade das aves observou-se melhora da conversão alimentar em todos os tratamentos em relação ao controle negativo, mesmo sem terem sido detectados efeitos significativos para ganho de peso e consumo de ração. Aos 42 dias (Tabela 5), embora não tenham sido detectadas diferenças significativas ($P>0,05$), o ganho de peso das aves recebendo β -ácidos chegou a ser 59 g e 45 g superior ao do CN e CP, respectivamente. Houve melhora na conversão alimentar das aves ($P<0,05$) recebendo β -ácidos ou promotor de crescimento, chegando a 0,05 para o tratamento com 30 mg/kgde β -ácidos (ou 2,8%) em relação ao CN.

Tabela 5 - Desempenho produtivo de frangos de corte aos 42 dias suplementados com níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo

Tratamentos	1-42 dias					
	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA	Viab (%)	IEP
CN	3027	2988	5344	1,788 a	89,1	354,4
CP	3045	3002	5237	1,745 b	91,0	372,9
CN+30 mg/kg	3087	3047	5296	1,738 b	92,0	384,0
CN+60 mg/kg	3053	3016	5310	1,761 ab	89,6	365,7
CN+120 mg/kg	3000	2966	5244	1,768 ab	90,0	359,4
CN+240 mg/kg	3063	3026	5273	1,742 b	86,0	356,7
CV(%)	2,04	2,07	1,95	1,69	5,58	6,07
Valor de P	NS	NS	NS	0,03	NS	NS

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; IEP: Índice de Eficiência Produtiva; CN: controle negativo; CP: Controle Positivo; CV: coeficiente de variação

Um fato que deve ser destacado é que, ao início do experimento, o nível mais alto de β -ácidos (240 mg/kg) pareceu ser prejudicial ao desempenho dos frangos, chegando a provocar redução de 4,3% ($P < 0,05$) no ganho de peso em relação ao controle negativo aos 21 dias de idade, em decorrência da diminuição de 8,2% do consumo de ração. Entretanto, a partir dessa idade foi observada uma reversão dessa tendência, sendo que aos 35 dias a diferença desapareceu e aos 42 dias o ganho de peso acumulado foi 1,2% maior (não significativo); da mesma forma, a conversão alimentar obtida com o nível mais alto de β -ácidos era pior do que a do controle positivo aos 21 dias e foi semelhante aos 42 dias. Além disso, a viabilidade e o Índice de Eficiência Produtiva (IEP) não foram afetados estatisticamente pelos tratamentos, embora observou-se que o IEP foi mais elevado no controle positivo (5,2%) e no tratamento 30 mg/kg de β -ácidos (8,3%), coincidentemente foram os tratamentos com maior viabilidade, em relação ao controle negativo.

À semelhança dos nossos resultados, Cornelison et al. (2006) observaram que aos 35 dias de idade o peso vivo dos frangos que receberam doses crescentes de extrato de lúpulo na dieta foi reduzido em comparação ao controle positivo, suplementado com penicilina. Entretanto, aos 42 dias os autores reportaram que a dose mais baixa do lúpulo (227 mg/kg) proporcionou peso semelhante, apesar da conversão alimentar ter piorado independente do nível utilizado.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Ensaio de campo

Com objetivo de desafiar as aves de maneira mais severa, aos 14 dias de idade das aves, realizou-se a inoculação de oocistos esporulados vivos de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*, nos tratamentos 3 ao 6. Além disso, optou-se pela inclusão de 5% de farinha de penas e vísceras na ração em todas as fases de criação das aves. A infecção com *Eimeria* pode propiciar a proliferação de bactérias anaeróbicas, caso do *Clostridium perfringens*, e o ingrediente de origem animal pode servir de substrato ou fonte dessas bactérias. Desta forma, até os 14 dias, o experimento continha apenas 4 tratamentos, ou seja, o controle negativo e positivo e mais dois tratamentos com os dois níveis de β -ácidos (30 e 240 mg/kg). Os dados de desempenho produtivo das aves de 1 a 7 e de 1 a 14 dias de idade, estão mostrados na Tabela 6.

Não houve efeito dos tratamentos sobre o peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. Entretanto, Cornelison et al. (2006) observaram maior peso vivo, aos 14 dias, em aves suplementadas com antimicrobiano melhorador de desempenho, que foi semelhante ao menor nível de lúpulo utilizado (equivalente a 23 mg/kg de β -ácidos). Por outro lado, neste mesmo estudo o aumento da inclusão de lúpulo ocasionou pior desempenho das aves aos 14 dias de idade. Em nosso experimento, observou-se, aos 14 dias, que o consumo de ração tendeu a diminuir em virtude do maior nível de β -ácidos utilizado, o que está de acordo com os resultados do experimento anterior.

Tabela 6 - Desempenho produtivo de frangos de corte de 1 a 7 e 1 a 14 dias de acordo com os tratamento

Tratamentos	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA
	1-7 dias			
CN	186	137	156	1,136
CP	188	138	155	1,122
30 mg/kg	183	134	154	1,152
240 mg/kg	186	136	154	1,130
CV(%)	3,17	4,38	3,90	3,09
Valor de P	NS	NS	NS	NS
	1-14 dias			
	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA
CN	487	438	591	1,350
CP	493	443	590	1,331
30 mg/kg	491	441	592	1,343
240 mg/kg	485	436	579	1,329
CV(%)	2,65	2,97	2,82	3,27
Valor de P	NS	NS	NS	NS

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CN: controle negativo; CP: Controle Positivo; CV: coeficiente de variação

Após o desafio experimental, realizado aos 14 dias de idade das aves, observou-se que o modelo adotado foi eficiente em causar alterações na homeostase das aves, observando-se sintomatologia característica de coccidiose. Algumas aves foram sacrificadas e necropsiadas, observando-se acentuado acometimento do intestino delgado e dos cecos (Figura 8). Entretanto, após decorridos seis dias desde a inoculação, a sintomatologia foi gradualmente desaparecendo.

Figura 8 - (A): Frangos com apatia após desafio experimental e, (B): Cecos com acometimento característico de infecção por *Eimeria tenella*

Os dados de desempenho produtivo dos frangos obtidos após o desafio experimental estão demonstrados nas Tabelas 7, 8 e 9. Observa-se na Tabela 7 que o desempenho na primeira semana após o desafio (14 a 21 dias de idade) foi

severamente prejudicado, chegando a redução de 46% no ganho de peso e 33% de piora na conversão alimentar, além de observar-se até 10,5% a mais de mortalidade das aves desafiadas em relação às não desafiadas, no referido período. Além disso, no período acumulado de 1 a 21 dias de idade, o peso vivo, ganho de peso e o consumo de ração diminuíram e a conversão alimentar das aves desafiadas piorou ($P < 0,0001$) em relação às aves não desafiadas (Tabela 8).

À semelhança dos nossos resultados, outras pesquisas evidenciaram o efeito da coccidiose sobre a conversão alimentar e mortalidade das aves (COX et al., 2010). Orengo et al. (2012) não observaram efeito de aditivos fitogênicos sobre o ganho de peso de frangos desafiados com *Eimeria acervulina*. Em contrapartida, frangos experimentalmente infectados com 2×10^4 oocistos de *Eimeria maxima* ou de *Eimeria tenella* e suplementados com *Curcuma longa* apresentaram menores perdas no ganho de peso aos 21 dias de idade (KIM et al., 2013). Além disso, esses autores observaram que *Eimeria tenella* causou menor efeito sobre o ganho de peso quando comparada com a *Eimeria maxima*.

Adicionalmente, Scheurer et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes aos nossos, sendo que na primeira semana após o desafio a conversão alimentar foi severamente prejudicada nos tratamentos suplementados com extratos vegetais em comparação ao grupo não desafiado ou desafiado e suplementados com anticoccidiano. Apesar disto, nas semanas seguintes as aves apresentaram recuperação, sendo que ao final do período experimental, aos 39 dias de idade, os grupos suplementados com orégano ou *Curcuma*, saponina e inulina, foram semelhantes ao tratamento que recebeu coccidiostático (narasina).

Tabela 7 - Desempenho produtivo semanal de frangos de corte após desafio experimental, de acordo com os tratamentos

Tratamentos	GP (g)	CR (g)	CA	Viab (%)
14-21 dias				
CN	485 a	726 a	1,497 b	99,5 a
CP	496 a	747 a	1,506 b	99,6 a
CN+desafio	267 b	603 b	2,258 a	92,9 b
CP+desafio	292 b	620 b	2,123 a	90,7 b
30 mg/kg+desafio	284 b	624 b	2,197 a	93,3 b
240 mg/kg+desafio	291 b	611 b	2,099 a	89,0 b
CV(%)	6,31	4,37	5,00	3,58
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
21-28 dias				
CN	696 ab	1069 a	1,537	100
CP	713 a	1087 a	1,524	99,1
CN+desafio	682 ab	1047 ab	1,537	100
CP+desafio	699 ab	1063 ab	1,521	99,5
30 mg/kg+desafio	665 b	1017 b	1,528	99,5
240 mg/kg+desafio	690 ab	1055 ab	1,529	99,0
CV(%)	2,99	2,76	2,20	1,13
Valor de P	0,003	0,009	NS	NS
28-35 dias				
CN	713	1279 ab	1,795	100
CP	733	1330 a	1,824	99,5
CN+desafio	723	1255 ab	1,738	99,5
CP+desafio	739	1263 ab	1,708	100
30 mg/kg+desafio	721	1228 b	1,705	99,5
240 mg/kg+desafio	720	1246 ab	1,732	97,5
CV(%)	5,49	4,25	4,51	1,04
Valor de P	NS	0,03	0,09	NS
35-42 dias				
CN	704	1474 b	2,097	100
CP	763	1602 a	2,100	98,7
CN+desafio	720	1509 ab	2,098	98,7
CP+desafio	740	1509 ab	2,040	99,2
30 mg/kg+desafio	731	1476 b	2,022	98,9
240 mg/kg+desafio	738	1467 b	1,989	99,5
CV(%)	5,45	4,53	4,72	1,32
Valor de P	NS	0,009	NS	NS

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CN: controle negativo; CP: Controle Positivo; CV: coeficiente de variação

Tabela 8 - Desempenho produtivo acumulado (21, 28 e 35 dias) de frangos de corte suplementados com β -ácidos do lúpulo e desafiados com *Eimeria* sp

Tratamentos	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA
1-21 dias				
CN	975 a	923 a	1315 a	1,425 b
CP	988 a	935 a	1338 a	1,430 b
CN+desafio	757 b	705 b	1195 b	1,697 a
CP+desafio	789 b	740 b	1210 b	1,636 a
30 mg/kg+desafio	775 b	725 b	1215 b	1,678 a
240 mg/kg+desafio	776 b	727 b	1189 b	1,639 a
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV(%)	2,79	3,01	2,78	4,08
1-28 dias				
CN	1671 a	1619 a	2385 a	1,473 b
CP	1706 a	1649 a	2425 a	1,471 b
CN+desafio	1438 b	1387 b	2242 b	1,618 a
CP+desafio	1487 b	1438 b	2273 b	1,580 a
30 mg/kg+desafio	1441 b	1391 b	2233 b	1,606 a
240 mg/kg+desafio	1467 b	1417 b	2245 b	1,584 a
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV(%)	2,49	2,70	2,18	2,65
1-35 dias				
CN	2384 a	2333 a	3364 ab	1,571 c
CP	2440 a	2382 a	3755 a	1,577 bc
CN+desafio	2161 b	2110 b	3497 ab	1,659 a
CP+desafio	2227 b	2178 b	3536 b	1,623 abc
30 mg/kg+desafio	2162 b	2112 b	3461 b	1,640 a
240 mg/kg+desafio	2191 b	2137 b	3491 b	1,633 ab
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0006
CV(%)	2,90	3,01	2,21	2,17

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CN: controle negativo; CP: Controle Positivo; CV: coeficiente de variação

Os danos intestinais causados pela coccidiose causam diminuição da absorção de nutrientes, ineficiente utilização de alimentos, diminui o ganho de peso e em casos severos causa mortalidade (JANG et al., 2010). O que ainda não está claro é o efeito que o parasita possui na destruição do epitélio intestinal versus a lesão tecidual causada pela inflamação descontrolada no local da infecção e o efeito metabólico no hospedeiro (KIM et al., 2013). Em geral, animais jovens são mais susceptíveis à coccidiose e apresentam sinais clínicos da doença mais evidentes, enquanto animais velhos são relativamente resistentes à infecção (LILLEHOJ, 1998). Por outro lado, animais jovens que recuperam-se de surtos de coccidiose podem ser capazes de compensar a perda de desempenho, embora o potencial de crescimento esteja severamente comprometido (YUN et al., 2000).

Os nossos resultados estão de acordo com as observações de Yun et al. (2000), pois na segunda semana após o desafio (21 a 28 dias) a conversão alimentar já foi semelhante entre os tratamentos, apesar de ainda observar-se pior ganho de peso e consumo de ração nas aves desafiadas. (Tabela 7). Por outro lado, nos períodos de 28 a 35 e 35 a 42 dias de idade (Tabela 7) verificou-se que o ganho de peso foi semelhante entre os tratamentos, e a conversão alimentar, apesar de não significativa, chegou a ser 6,5 e 5% melhor, respectivamente, nas aves desafiadas em comparação às aves não desafiadas. Pode-se especular que existe um ganho compensatório após a recuperação das aves, em virtude do aumento da proliferação epitelial intestinal para compensar a absorção de nutrientes, e recuperação do processo inflamatório exacerbado ocorrido no intestino, com desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa. Além disso, com o avanço da idade das aves o turnover 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).

Por outro lado, avaliando-se os períodos acumulados, aos 35 dias observou-se que apesar do peso vivo e o ganho de peso serem piores nas aves desafiadas, a conversão alimentar apresentou significativa melhora nas aves desafiadas e suplementadas com antimicrobiano ou 240 mg/kg de β -ácidos (Tabela 8). Ao final do período experimental, 42 dias de idade (Tabela 9), constatou-se que o ganho de peso e consumo de ração foram maiores nas aves suplementadas com antimicrobiano e não desafiadas. A conversão alimentar das aves desafiadas e suplementadas com algum aditivo apresentou discreta melhora, apesar de não diferir do grupo desafiado sem suplementação. A mortalidade do período total de criação foi maior nos grupos das aves desafiadas. Além disso, o Índice de Eficiência Produtiva (IEP) diminuiu significativamente devido à infecção por coccidiose, chegando à redução de 22% das aves desafiadas em relação às aves não desafiadas. Isso significa impacto importante para o produtor de frangos de corte integrado, haja visto que muitas integrações avícolas utilizam este índice como forma de remuneração.

Tabela 9 - Desempenho produtivo de frangos de corte aos 42 dias suplementados com β -ácidos do lúpulo e desafiados com *Eimeria* sp

Tratamentos	1-42 dias					
	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA	Viab (%)	IEP
CN	3088 ab	3037 ab	5138 ab	1,692 b	99,2 a	436 a
CP	3203 a	3145 a	5357 a	1,704 b	96,7 ab	440 a
CN+desafio	2880 c	2830 c	5005 b	1,769 a	90,8 bc	357 b
CP+desafio	2966 bc	2918 bc	5045 b	1,729 ab	88,7 c	367 b
30 mg/kg+desafio	2892 c	2843 c	4937 b	1,737 ab	90,0 bc	361 b
240 mg/kg+desafio	2928 c	2875 bc	4558 b	1,724 ab	84,5 c	344 b
Valor de P	<0,0001	<0,0001	0,0006	0,01	<0,0001	<0,0001
CV(%)	2,95	3,02	2,69	1,98	4,35	6,59

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CN: controle negativo; CP: controle positivo; CV: coeficiente de variação

Tradicionalmente, drogas anticoccidianas e antimicrobianos possuem alta efetividade em minimizar as perdas de ganho de peso associadas com a coccidiose aviária. Entretanto, nenhum dos aditivos utilizados neste estudo foi capaz de prevenir a perda de desempenho ocasionada pela coccidiose, na primeira semana pós infecção, ou em auxiliar na recuperação das aves no período seguinte, apesar de observar-se moderado efeito dos aditivos no período total (1 a 42 dias), sendo que as diferenças de ganho de peso observadas chegaram a 88 e 45 g nas aves desafiadas e suplementadas com antimicrobiano ou 240 mg/kg de β -ácidos, respectivamente, em comparação com as aves desafiadas sem receber aditivo na dieta. Em nossa pesquisa, não foi utilizado anticoccidiano, entretanto esperava-se que o maior nível de β -ácido apresentasse efeito contra a coccidia ou como auxiliar na recuperação pós infecção. Entretanto, devemos levar em consideração que a dose inoculada foi elevada, apesar de estar de acordo com Hume et al. (2006) e Oviedo-Rondon et al. (2006), e em caso de uma infecção mais branda os β -ácidos pudessem ter melhor efeito.

Nutrientes e aditivos são rotineiramente pesquisados com a finalidade de diminuir as perdas causadas pela coccidiose (ALLEN et al., 1997; KIDD et al., 2003; PERSIA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2012; KIM et al., 2013). A magnitude das perdas variam de acordo com a espécie da *Eimeria* envolvida, embora frequentemente sejam consideráveis, pelo fato de em um surto estarem envolvidas mais de uma espécie, específicas para cada região do intestino (CORNELISSEN et al., 2009). Por exemplo, Allen et al. (1997) verificaram que as perdas de ganho de peso e os escores de lesão foram maiores quando as aves foram desafiadas com

Eimeria maxima em comparação com *Eimeria tenella*. Ao contrário do que foi obtido em nosso estudo, Cornelissen et al. (2009), verificaram que quando as aves foram desafiadas com *Eimeria acervulina* e *E. tenella* não houve prejuízo no ganho de peso, apesar de a dose infectante ser 4 e 2,5% menor, respectivamente, do que a utilizada nesta pesquisa.

Um fato que deve ser levado em consideração em casos de coccidiose é a diminuição da digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes. De acordo com Persia et al. (2006) a coccidiose, especialmente àquela causada por *E. acervulina*, reduz a energia metabolizável da dieta, bem como a digestibilidade dos aminoácidos. Devido ao fato do duodeno ser o principal sítio de ação das enzimas digestivas, lesões que acometem essa região do intestino, podem ter efeito significativo ao longo de todo trato gastrointestinal.

Em nossa pesquisa, após decorrido a recuperação da sintomatologia das aves, frequentemente se observou elevada quantidade de alimento não digerido nas fezes, principalmente grânulos de milho, (Figura 9), o que pode significar aumento do substrato disponível para as bactérias presentes nas porções posteriores do intestino.

Figura 9 - Presença de alimento não digerido nas excretas das aves, após recuperação da sintomatologia característica de coccidiose

4.2.2 Microbiota Intestinal

O desenvolvimento da microbiota intestinal de frangos de corte inicia no momento da eclosão. As aves recém eclodidas são inicialmente expostas aos micro-organismos oriundos da superfície da casca do ovo, que possui bactérias originárias do intestino da matriz e do ambiente circundante. Portanto, a densidade bacteriana do intestino aumenta rapidamente pós eclosão, sendo que a máxima densidade é verificada com menos de uma semana de vida do frangos, permanecendo constante pelos 30 dias que se seguem (RINTTILA; APAJALAHTI, 2013).

As bactérias pertencentes ao microbioma intestinal podem ser categorizadas como comensais ou patogênicas. Ambas populações podem ser afetadas por uma série de fatores, tais como, manejo da cama, dieta e aditivos alimentares. Tem sido reconhecido que o melhor entendimento das interações entre os micro-organismos, hospedeiro e o alimento ingerido é necessário para melhorar a nutrição dos frangos e a saúde intestinal. Entretanto, a falta de conhecimento suficiente sobre a diversidade bacteriana no intestino de frangos é considerado um dos maiores limitantes para entender tais interações (WEI et al., 2013).

Pelo fato das técnicas normais de cultivo limitarem o entendimento do microbioma intestinal (PEDROSO et al., 2012), o estudo da ecologia intestinal através de técnicas moleculares é, sem dúvida, eficiente para conhecer e entender o ecossistema intestinal. O uso das técnicas de biologia molecular baseadas no uso do DNA revelam que existe maior complexidade e diversidade do que se imaginava, e permitiu a expansão da perspectiva de estudo da comunidade microbiana, em termos de composição, diversidade e estrutura (WEI et al., 2013).

Em nossa pesquisa estudamos o efeito dos β -ácidos do lúpulo sobre o equilíbrio da microbiota oriunda do intestino delgado e ceco de frangos de corte, após desafio com *Eimeria*. Foram realizadas coletas aos 7 e 21 dias após o desafio, ou seja, aos 21 e 35 dias de idade das aves. Entretanto, não foi possível avaliar a população cecal aos 21 dias de idade (7 dias após o desafio) devido à resposta inflamatória exacerbada ocorrida em virtude do desafio. No momento da coleta observou-se que o ceco estava amplamente comprometido, com ausência de conteúdo. Portanto, analisou-se a microbiota do intestino delgado aos 21 dias de idade e do intestino delgado e ceco aos 35 dias de idade.

De maneira geral, em todas as amostras foram identificados aproximadamente 100 a 150 gêneros bacterianos diferentes. Aos 21 dias de idade, no intestino delgado predominaram os gêneros *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*, com frequência diferenciada de acordo com cada tratamento (Tabela 10). Gêneros de importância na manutenção da saúde do intestino, principalmente alguns que são utilizados como probióticos, tais como *Bacillus* e *Pediococcus* (LEE et al., 2007) também foram identificados, apesar de não variarem entre os tratamentos. Os valores de P observados nos testes de qui-quadrado estão demonstrados na Tabela 11. Estão demonstrados apenas os valores de P para os gêneros predominantes, haja vista que para os demais gêneros não se observaram diferenças nas comparações realizadas.

Tabela 10 - Frequência (%) de 16S rDNA bacteriano isolado no intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade

Genero	CN	CP	CN+ desafio	CP+ desafio	30mg/kg+ desafio	240mg/kg +desafio
<i>Lactobacillus</i>	33,1	34,1	42,7	48,9	56,9	48,5
<i>Clostridium</i>	12,2	4,0	20,7	16,4	13,8	8,8
<i>Staphylococcus</i>	7,5	8,8	1,7	5,8	2,3	2,9
<i>Bacillus</i>	0,006	0,056	0,008	0,003	0,018	0,026
<i>Pediococcus</i> *	0,025	ND	0,008	ND	0,005	0,002
<i>Bacteroides</i>	0,082	0,028	0,774	0,019	0,052	0,009
<i>Fecalibacterium</i>	0,094	0,056	0,384	0,007	0,063	0,018
<i>Coprococcus</i>	0,106	0,222	0,340	0,020	0,046	ND
<i>Ruminococcus</i>	0,064	0,087	0,146	0,017	0,031	0,017
<i>Bifidobacterium</i> *	ND	0,016	0,004	ND	0,005	0,009

CN: controle negativo; CP: controle positivo; CN+desafio: controle negativo + desafio; CP+desafio: controle positivo + desafio; 30mg/kg+desafio: 30 mg/kg de β -ácido + desafio; 240mg/kg+desafio: 30 mg/kg de β -ácido + desafio;

*ND: não detectado;

Tabela 11 - Valores de P das comparações de frequência de 16S rDNA bacteriano isolado do intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade*

Pares de comparação	Gênero	Valor de P
CN vs CP	<i>Lactobacillus</i>	0,85
	<i>Clostridium</i>	0,04
	<i>Staphylococcus</i>	0,74
CN vs CN+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,27
	<i>Clostridium</i>	0,14
	<i>Staphylococcus</i>	0,05
CP vs CP+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,12
	<i>Clostridium</i>	0,01
	<i>Staphylococcus</i>	0,44
CN+desafio vs CP+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,52
	<i>Clostridium</i>	0,48
	<i>Staphylococcus</i>	0,13
CN+desafio vs 30mg/kg+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,15
	<i>Clostridium</i>	0,24
	<i>Staphylococcus</i>	0,74
CN+desafio vs 240mg/kg+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,54
	<i>Clostridium</i>	0,03
	<i>Staphylococcus</i>	0,57

*Diferenças foram determinadas por pares de comparações de tratamentos. CN vs CP: Controle negativo vs Controle positivo; CN vs CN+desafio: Controle negativo vs Controle negativo+desafio; CP vs CP+desafio: Controle positivo vs Controle positivo+desafio; CN+desafio vs CP+desafio: Controle negativo vs Controle negativo+desafio; CN+desafio vs 30mg/kg+desafio: Controle negativo+desafio vs 30 mg/kg de β -ácidos + desafio; CN+desafio vs 240mg/kg+desafio: Controle negativo+desafio vs 240 mg/kg de β -ácidos + desafio

Quando foi avaliado o efeito do antibiótico (CN vs CP) observou-se que a população de *Clostridium* diminuiu significativamente (12,2 vs 4%), embora os demais gêneros não tenham sido afetados (Figura 10). O coccidiose também aumentou a frequência de *Clostridium* (4,0 vs 16,4%), apesar da presença do antibiótico na dieta (CP vs CP+desafio), ou seja, a bacitracina de zinco não foi eficiente em evitar a excessiva proliferação destas bactérias, ocorrida em virtude do desafio. Ao realizar as comparações entre as aves desafiadas, observamos que apenas o maior nível de β -ácidos foi eficaz em diminuir a população de *Clostridium*, em relação ao grupo desafiado sem receber aditivo na dieta (CN+desafio vs 240mg/kg +desafio, 20,4 vs 8,8%). O gênero *Staphylococcus* diminuiu na presença de coccidiose, quando comparado ao controle negativo (CN vs CN+desafio, 7,5 vs 1,7%). Essa diminuição pode ter ocorrido em virtude do severo aumento de *Clostridium* observado na presença de coccidiose (CN+desafio), devido à competição por nutrientes.

Figura 10 - Frequência (%) de *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* no intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade

Alguns autores já reportaram que os componentes do lúpulo são eficazes em diminuir a população de *Clostridium* no intestino de frangos, inclusive de *Clostridium perfringens* (SIRAGUSA et al., 2008; TILMANN et al., 2011). Entretanto, não existe estudo avaliando o efeito dos β -ácidos do lúpulo sobre a microbiota, na presença de coccidiose. Nós observamos que o desafio causou aumento da população de *Clostridium*, todavia, o maior nível de β -ácidos foi capaz de reduzir ($P < 0,05$) a concentração desta bactéria. Por outro lado, o gênero *Staphylococcus* diminuiu na presença de coccidiose, o que pode significar que ocorreu competição por nutrientes entre estes dois gêneros. Competição por nutrientes, carbono, energia, nitrogênio, ferro e vitaminas, entre espécies microbianas pode diminuir o crescimento de outra espécie e aumentar a taxa de exclusão do intestino (PEDROSO et al., 2012).

Nós optamos pela inclusão de 5% de farinha de penas e vísceras de aves, possivelmente contaminadas, isto é, sem tratamento prévio, nas rações em todas as fases de criação das aves. Isso pode ter imposto um desafio maior às aves, já que aos 21 dias de idade observamos maior população de *Clostridium* no controle negativo, comparado ao controle positivo. Portanto, a inclusão de antimicrobiano, *per se*, controlou a proliferação deste gênero, em situação de baixo desafio, o que pode levar ao menor custo metabólico para manutenção e justificar a melhora de desempenho do controle positivo em relação ao controle negativo. Isto estaria de acordo com Niewold (2007), que propôs 4 mecanismos de ação dos antimicrobianos

nas dietas dos animais: inibição de infecções subclínicas, reduzindo o custo metabólico do sistema imune; redução da produção de metabólitos por micro-organismos intestinais; redução da utilização de nutrientes pelos micro-organismos; e aumento da captação de nutrientes, pois a parede do intestino de animais tratados com antimicrobianos apresenta-se mais fina, ou seja, menos inflamada.

Engberg et al. (2000), Pedroso et al. (2006) e Gong et al. (2008) estudaram o efeito da inclusão de antibióticos na dieta de frangos sobre as características da microbiota intestinal, sendo que nos três casos houve melhora no desempenho das aves e alteração da composição microbiana. A bacitracina de zinco mostrou-se eficiente em melhorar o desempenho e selecionar grupos bacterianos relacionados com melhor saúde intestinal (ENGBERG et al., 2000). Pedroso et al. (2006) verificaram que a inclusão de avilamicina, bacitracina metileno disalicilato ou enramicina melhorou o desempenho de frangos criados em cama e alterou a composição da microbiota intestinal, mas não reduziu o número de genótipos bacterianos detectados. Gong et al. (2008) reportaram que a bacitracina de zinco alterou a composição da microbiota ileal de frangos, principalmente em frangos jovens, quando a microbiota estava em fase de estabelecimento.

A inclusão de aditivos que remodelam a microbiota intestinal tem sido profundamente estudada. Alguns estudos visam melhorar a microbiota através do fornecimento de micro-organismos via dieta (PEDROSO et al., 2012) ou pela utilização de aditivos que propiciem a multiplicação de bactérias consideradas probióticas. Em nosso estudo, aos 21 dias de idade observamos que o gênero *Pediococcus* não foi detectado quando os frangos receberam antibiótico, independente da presença da coccidia (Tabela 10). Entretanto, conforme verificado, o maior nível de β -ácidos do lúpulo reduziu a população de *Clostridium* ao mesmo tempo que manteve gêneros probióticos, como *Bacillus* e *Pediococcus*.

As frequências dos gêneros bacterianos verificados aos 35 dias de idade no intestino delgado, estão demonstrados na Tabela 12 e os valores de P na Tabela 13. Nessa idade das aves, houve a predominância dos mesmos gêneros que na fase anterior, ou seja, *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*, mas em diferentes proporções (Figura 11). Houve aumento do gênero *Lactobacillus* no tratamento controle positivo+desafio quando comparado ao tratamento controle positivo ($P < 0,05$). Entre as aves desafiadas ocorreu aumento ($P \leq 0,05$) de *Lactobacillus* nos

tratamentos CP+desafio e 30mg/kg+desafio em comparação ao tratamento CN+desafio.

A frequência de *Clostridium* foi alterada de maneira oposta ao observado na fase anterior. Observou-se aumento no tratamento controle positivo em relação ao controle positivo+desafio (20, 7 vs 5,6%). Além disso, o menor nível de β -ácidos propiciou maior proliferação deste gênero comparado ao controle negativo+desafio (27,3 vs 9,1%). Pode-se especular que as bactérias deste gênero são capazes de desenvolver resistência na presença de baixas doses de β -ácidos, justificando a elevada porcentagem observada nessa idade. Conforme observado, 7 dias após a inoculação com *Eimeria* o maior nível de β -ácidos foi eficiente em evitar a proliferação de *Clostridium*, sendo que o mesmo não ocorreu 21 dias após a infecção.

Tabela 12 - Frequência (%) de 16S rDNA bacteriano isolado no intestino delgado de frangos de corte aos 35 dias de idade

Genero	CN	CP	CN+ desafio	CP+ desafio	30mg/kg+ desafio	240mg/kg +desafio
<i>Lactobacillus</i>	57,1	47,8	43,4	69,8	64,1	37,6
<i>Clostridium</i>	10,4	20,7	9,1	5,6	27,3	15,1
<i>Staphylococcus</i>	0,7	1,1	3,3	1,6	0,6	0,5
<i>Faecalibacterium</i>	0,195	0,386	0,450	0,224	0,070	0,495
<i>Ruminococcus</i>	0,076	0,285	0,000	0,104	0,033	0,439
<i>Bacteroides</i>	0,148	0,371	0,678	0,152	0,050	1,795
<i>Bacillus</i>	0,014	0,028	ND	0,057	0,026	ND
<i>Coprococcus</i>	ND	0,069	ND	0,126	ND	0,071

CN: controle negativo; CP: controle positivo; CN+desafio: controle negativo + desafio; CP+desafio: controle positivo + desafio; 30mg/kg+desafio: 30 mg/kg de β -ácido + desafio; 240mg/kg+desafio: 30 mg/kg de β -ácido + desafio;

*ND: não detectado;

Tabela 13 - Valores de P das comparações de frequência de 16S rDNA bacteriano isolado do intestino delgado de frangos de corte aos 35 dias de idade*

Pares de comparação	Gênero	Valor de P
CN vs CP	<i>Lactobacillus</i>	0,37
	<i>Clostridium</i>	0,06
	<i>Staphylococcus</i>	0,79
CN vs CN+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,17
	<i>Clostridium</i>	0,77
	<i>Staphylococcus</i>	0,21
CP vs CP+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,04
	<i>Clostridium</i>	0,003
	<i>Staphylococcus</i>	0,77
CN+desafio vs CP+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,01
	<i>Clostridium</i>	0,36
	<i>Staphylococcus</i>	0,44
CN+desafio vs 30mg/kg+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,05
	<i>Clostridium</i>	0,01
	<i>Staphylococcus</i>	0,17
CN+desafio vs 240mg/kg+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,52
	<i>Clostridium</i>	0,22
	<i>Staphylococcus</i>	0,14

*Diferenças foram determinadas por pares de comparações de tratamentos. CN vs CP: Controle negativo vs Controle positivo; CN vs CN+desafio: Controle negativo vs Controle negativo+desafio; CP vs CP+desafio: Controle positivo vs Controle positivo+desafio; CN+desafio vs CP+desafio: Controle negativo vs Controle negativo+desafio; CN+desafio vs 30mg/kg+desafio: Controle negativo+desafio vs 30 mg/kg de β -ácidos + desafio; CN+desafio vs 240mg/kg+desafio: Controle negativo+desafio vs 240 mg/kg de β -ácidos + desafio

Figura 11 - Frequência (%) de *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* no intestino delgado de frangos de corte aos 35 dias de idade

Os gêneros predominantes do ceco das aves aos 35 dias de idade foram diferentes aos encontrados no intestino delgado na mesma idade. Houve predominância de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Bacteroides* (Tabela 14 e Figura 12). Em alguns casos, a população de *Clostridium* foi maior que a de *Lactobacillus*. Nas fases anteriores, no intestino delgado o terceiro gênero mais predominante era o *Staphylococcus*, contudo, nos cecos, o terceiro gênero com maior população foi *Bacteroides*. Comparando-se os valores, observa-se que o somatório dos gêneros mostrados é inferior encontrado no intestino delgado, ou seja, nos cecos a frequência de gêneros não identificados foi maior que no intestino delgado, o que pode ser atribuído à maior diversidade bacteriana que geralmente está presente nos cecos.

Na Tabela 15 estão mostrados os valores de P das comparações realizadas. Observa-se que a única diferença foi para *Bacteroides* quando se comparou o controle negativo com o controle negativo+desafio (CN vs CN+desafio, 2,7 vs 10,5%). Quando os frangos foram desafiados com coccidia e não receberam nenhum aditivo na dieta, a frequência de *Bacteroides* foi maior, quando comparada apenas ao tratamento controle negativo.

Tabela 14 - Frequência (%) de 16S rDNA bacteriano isolado nos cecos de frangos de corte aos 35 dias de idade

Genero	CN	CP	CN+ desafio	CP+ desafio	30mg/kg+ desafio	240mg/kg +desafio
<i>Lactobacillus</i>	13,8	10,6	18,3	13,6	14,7	18,1
<i>Clostridium</i>	12,7	15,6	11,7	12,2	14,8	8,3
<i>Bacteroides</i>	2,7	3,8	10,5	8,6	8,0	7,6
<i>Faecalibacterium</i>	1,848	2,077	0,979	2,025	0,596	0,000
<i>Staphylococcus</i>	0,478	0,009	0,034	0,009	0,014	0,005
<i>Ruminococcus</i>	1,092	1,119	1,417	2,077	1,679	2,249
<i>Coprococcus</i>	0,416	0,608	0,000	0,403	0,409	0,651
<i>Campylobacter</i>	0,037	0,082	0,671	0,158	0,162	0,128
<i>Bacillus</i>	0,007	0,007	0,550	0,118	1,055	0,055

CN: controle negativo; CP: controle positivo; CN+desafio: controle negativo + desafio; CP+desafio: controle positivo + desafio; 30mg/kg+desafio: 30 mg/kg de β -ácido + desafio; 240mg/kg+desafio: 30 mg/kg de β -ácido + desafio;

*ND: não detectado;

Tabela 15 - Valores de P das comparações de frequência de 16S rDNA bacteriano isolado dos cecos de frangos de corte aos 35 dias de idade*

Pares de comparação	Gênero	Valor de P
CN vs CP	<i>Lactobacillus</i>	0,52
	<i>Clostridium</i>	0,58
	<i>Bacteroides</i>	0,66
CN vs CN+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,42
	<i>Clostridium</i>	0,84
	<i>Bacteroides</i>	0,03
CP vs CP+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,55
	<i>Clostridium</i>	0,51
	<i>Bacteroides</i>	0,17
CN+desafio vs CP+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,41
	<i>Clostridium</i>	0,92
	<i>Bacteroides</i>	0,67
CN+desafio vs 30mg/kg+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,54
	<i>Clostridium</i>	0,55
	<i>Bacteroides</i>	0,57
CN+desafio vs 240mg/kg+desafio	<i>Lactobacillus</i>	0,97
	<i>Clostridium</i>	0,44
	<i>Bacteroides</i>	0,50

*Diferenças foram determinadas por pares de comparações de tratamentos. CN vs CP: Controle negativo vs Controle positivo; CN vs CN+desafio: Controle negativo vs Controle negativo+desafio; CP vs CP+desafio: Controle positivo vs Controle positivo+desafio; CN+desafio vs CP+desafio: Controle negativo vs Controle negativo+desafio; CN+desafio vs 30mg/kg+desafio: Controle negativo+desafio vs 30 mg/kg de β -ácidos + desafio; CN+desafio vs 240mg/kg+desafio: Controle negativo+desafio vs 240 mg/kg de β -ácidos + desafio

Figura 12 - Frequência (%) de *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Bacteroides* nos cecos de frangos de corte aos 35 dias de idade

Pelo fato do pior desempenho das aves ter ocorrido nos tratamentos desafiados, pode-se aventar que as bactérias do gênero *Bacteroides* estão relacionadas à menor eficiência alimentar das aves. À semelhança de outros animais, a microbiota intestinal de aves é dominada pelos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Estudos mostram que humanos que perdem peso possuem mais *Bacteroidetes* e menos *Firmicutes*, enquanto que em roedores obesos ocorre o oposto (LEY et al., 2006). Os nossos resultados estão de acordo com o que está descrito na literatura, pois observamos que as aves desafiadas, que tiveram pior desempenho, exibiram maior frequência de *Bacteroides* no ceco aos 35 dias de idade.

Além disso, apesar de não se verificar diferença nas comparações realizadas, a população de *Campylobacter* aumentou nos tratamentos em que as aves foram desafiadas (Figura 13). Bactérias do gênero *Campylobacter* podem colonizar os cecos das aves e levar a problemas de contaminação das carcaças no momento do abate, sendo frequentemente associadas com gastroenterites em humanos (ROBYN et al., 2013). Portanto, infecções de coccidiose podem levar também a problemas qualitativos na carne pelo estímulo à proliferação de certas linhagens bacterianas, além dos problemas relacionados à lesão epitelial do intestino.

Figura 13 - Frequência (%) de *Campylobacter* nos cecos de frangos de corte aos 35 dias de idade

Infecção por *Eimeria* possui forte efeito sobre as bactérias dominantes e, assim, sobre a composição da microbiota intestinal (MARTYNOVA-VAN KLEY et al.,

2012). Os resultados da pesquisa destes autores, sugerem que a elevada abundância de *Bacteroides* nos cecos está correlacionada com pior conversão alimentar. Além disso, animais com baixa digestibilidade e absorção de nutrientes possuem maior proliferação destas bactérias nos cecos, provavelmente devido à maior disponibilidade de nutrientes não digeridos. Em nosso estudo, após decorridos alguns dias do desafio das aves, observamos elevada quantidade de alimento não digerido nas excretas, principalmente grânulos de milho, o que significar que bactérias indesejáveis tiveram substrato disponível para multiplicar-se.

Em adição, Hume et al. (2006) estudaram o efeito da coccidiose sobre manutenção do equilíbrio da microbiota antes e após o desafio em frangos suplementados com antimicrobianos ou óleos essenciais. Estes autores verificaram que a similaridade do padrão microbiano antes e após o desafio foi de apenas 36% nos cecos das aves. Quando os frangos receberam bacitracina metileno disalicilato este valor foi de 60%, enquanto que em aves suplementadas com óleos essenciais (Crina Poultry) a similaridade atingiu 76%.

Em nosso estudo verificamos aumento da proliferação de bactérias do gênero *Clostridium* apenas no intestino delgado, aos 21 dias de idade das aves, sendo que posteriormente os valores foram similares entre os tratamentos. Infelizmente, o gênero *Clostridium* é conhecido devido à espécie *Clostridium perfringens*. Entretanto, o *C. perfringens* é apenas distantemente relacionado com a maioria das 129 espécies dentro do gênero *Clostridium*. Portanto, o termo genérico clostridia não deve ser automaticamente associado com baixa saúde e desempenho de frangos de corte (RINTTILA; APAJALAHTI, 2013).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os β -ácidos do lúpulo na forma microencapsulada possuem potencial para serem utilizados nas dietas de frangos de corte, sendo que em situações de desafio sanitário moderado, baixos níveis (30 mg/kg) foram capazes de proporcionar o mesmo desempenho produtivo que o antimicrobiano (30 mg/kg de bacitracina de zinco). Por outro lado, quando ocorreu infecção maciça por *Eimeria* sp., os β -ácidos não foram capazes de reverter o quadro provocado pela coccidiose, embora o maior nível (240 mg/kg) tenha sido capaz de diminuir a população de bactérias do gênero *Clostridium*, 7 dias após a infecção.

A coccidiose aviária é uma doença que causa grande impacto na produção de frangos de corte, conforme verificado neste estudo, sendo que as perdas podem aumentar caso ocorra a proibição do uso dos anticoccidianos. Portanto, medidas que possam minimizar as perdas devido às lesões causadas pela doença ou auxiliar na recuperação das aves após a infecção devem ser intensamente pesquisadas diante do atual cenário da produção avícola.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WARETH, A.A.A.; KEHRAUS, S.; HIPPENSTIEL, F.; SUDEKUM, K.H. Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers. **Animal feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 178, n. 3/4, p. 198-202, 2012.

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 toxin-encoding gene (*plc*). **Animal feed Science and Technology**. Philadelphia, v. 157, p. 181-189, 2010.

ALLEN, P.C.; FETTERER, R.H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 15, n. 1, p. 58-65, 2002.

ALLEN, P.C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. D. Effects of components of *Artemisia annua* on Coccidia infections in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 8, p. 1156-1163, 1997.

ALMEIDA, G.F.; HORSTED, K.; THAMSBORG, S.M.; KYVSGAARD, N.C.; FERREIRA, J.F.S.; HERMANSEN, J.E. Use of *Artemisia annua* as a natural coccidiostat in free-range broilers and its effects on infection dynamics and performance. **Veterinary Parasitology**. Philadelphia, v. 186, n. 3/4, p. 178-187, 2012.

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

APAJALAHTI, J.H.A.; SARKILAHTI, L.K.; HEIKKINEN, J.P.; NYRMINEN, P.H.; HOLBEN, W.E. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanosine-plus-cytosine based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 64, n. 10, p. 4084-4088, 1998.

APPLEGATE, T.J.; KLOSE, V.; STEINER, T.; GANNER, A.; SCHATZMAYR, G. Probiotics and phytochemicals for poultry: Myth or reality? **Journal Applied Poultry Research**. Champaign, v. 19, n. 2, p. 194-210, 2010.

BABA, E.; IKEMOTO, T.; FUKATA, T.; SASAI, K.; ARAKAWA, A.; MCDUGALD, L.R. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. **Veterinary Parasitology**. Philadelphia, v. 54, n. 3/4, p. 301-308, 1997.

BIENDL, M.; PINZL, C. **Hops and health**. Deutsches Hopfenmuseum Wolnzach: Wolnzach, 2008. 127 p.

BONA, T.D.M.M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L.B.; KURITZA, L.N.; VASCONCELOS, S.P.; SANTIN, E. Oleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 5, p. 411-418, 2012.

BOZKURT, M.; KÜÇÜKYILMAZ, K.; ÇATLI, A. U.; CINAR, M. Effect of dietary mannan oligosaccharide with or without oregano essential oil and hop extract supplementation on the performance and slaughter characteristics of male broilers. **South African Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 39, n. 3, p. 223-232, 2009.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 158, n. 1/2, p. 1-14, 2010.

BRISBIN, J.T.; GONG, J.; SHARIF, S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Research Reviews**. Columbia, v. 9, n. 1, p. 101–110, 2008.

CASTANON, J.I.R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**. Champaign, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007.

CHAPMAN, H.D. A land mark contribution to poultry science: prophylactic control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 813-815, 2009.

CHIN, Y.; ANDERSON, H.H.; ALDERTON, G.; LEWIS, J.C. Antituberculous activity and toxicity of lupulon for the mouse. **Experimental Biology and Medicine**. Thousand Oaks, v. 70, p. 158–162, 1949.

CORNELISSEN, J.B.W.J.; SWINKELS, W.J.C.; BOERSMA, W.A.; REBEL, J.M.J. Host response to simultaneous infections with *Eimeria acervulina*, *maxima* and *tenella*: A cumulation of single responses. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 162, n. 1/2, p. 58-66, 2009.

CORNELISON, J.M.; YAN, F.; WATKINS, S.E.; LLOYD RIGBY; SEGAL, J.B.; WALDROUP, P.W. Evaluation of hops (*Humulus lupulus*) as an antimicrobial in broiler diets. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 5, n. 2, p. 134-136, 2006.

COX, C.M.; SUMNERS, L.H.; KIM, S.; McELROY, A.P.; BEDFORD, M.R.; DALLOUL, R.A. Immune response to dietary β -glucan in broiler chicks during an *Eimeria* challenge. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n. 12, p. 2597-2607, 2010.

CRESSMAN, M.D.; YU, Z.; NELSON, M.C.; MOELLER, S.J.; LILBURN, M.S.; ZERBY, H.N. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 76, n. 19, p. 6572–6582, 2010.

DAHIYA, J.P.; WILKIE, D.C.; VAN KESSEL, A.G.; DREW, M.D. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 129, n. 1/2, p. 60-88, 2006.

ENGBERG, R.S.; HEDEMAN, M.S.; LESER, T.D.; JENSEN, B.B. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 9, p. 1311-1319, 2000.

FUKUYAMA, E.H.; BERTECHINI, A.G.; GERALDO, A.; KATO, R.K.; MURGAS, L.D.S. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005. Suplemento.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S.; GUILLOT, J.F. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v. 62, p. 499-511, 2006.

GEIER, M.S.; MIKKELSEN, L.L.; TOROK, V.A.; ALLISON, G.E.; OLNOOD, C.G.; BOULIANNE, M.; HUGHES, R.J.; CHOCT, M. Comparison of alternatives to in-feed antimicrobials for the prevention of clinical necrotic enteritis. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 109, n. 4, p. 1329–1338, 2010.

GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M.; CHRISTAKI, F.; BOTSOGLOU, N.A.; SPAIS, A.B. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives of Animal Nutrition**, London, v. 57, n. 2, p. 99–106, 2003.

GONG, J.; FORSTER, R.J.; YU, H.; CHAMBERS, J.R.; SABOUR, P.M.; WHEATCROFT, R.; CHEN, S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 208, n. 1, p. 1-7, 2002.

GONG, J.; YU, H.; LIU, T.; GILL, J.J.; CHAMBERS, J.R.; WHEATCROFT, R.; SABOUR, P.M. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 104, n. 5, p. 1372–1382, 2008.

GRUESO, I.; DE BLAS, J.C.; CACHALDORA, P.; MENDEZ, J.; LOSADA, B.; GARCÍA-REBOLLAR, P. Combined effects of supplementation of diets with hops and of a substitution of starch soluble fiber on feed efficiency and prevention of digestive disorders in rabbits. **Animal feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 180, n. 1/4, p. 92-100, 2013.

GUBAN, J.; KORVER, D.R.; ALLISON, G.E.; TANNOCK, G.W. Relationship of dietary antimicrobial drug administration with broiler performance, decreased population levels of *Lactobacillus salivarius*, and reduced bile salt deconjugation in the ileum of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 2186-2194, 2006.

HASHEMI, S.R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. **Veterinary Research Communications**, New York, v. 35, n. 3, p. 169-180, 2011.

HASHEMI, S.R.; ZULKIFLI, I.; DAVOODI, H.; ZUNITA, Z.; EBRAHIMI, M. Growth performance, intestinal microflora, plasma fatty acid profile in broiler chickens fed herbal plant (*Euphorbia hirta*) and mix of acidifiers. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 178, n. 3/4, p. 167-174, 2012.

HUME, M.E.; CLEMENTE-HERNANDEZ, S.; OVIEDO-RONDON, E.O. Effects of feed additives and mixed *Eimeria* species infection on intestinal microbial ecology of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 2106–2111, 2006.

JANG, S.I.; LILLEHOJ, H.S.; LEE, S.H.; LEE, K.W.; PARK, M.S.; BAUCHAN, G.R.; LILLEHOJ, E.P.; BERTRAND, F.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S. Immunoenhancing effects of Montanide™ ISA oil-based adjuvants on recombinant coccidian antigen vaccination against *Eimeria acervulina* infection. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 172, n. 3/4, p. 221-228, 2010.

JEURISSEN, S.H.; LEWIS, F.; VAN DER KLIS, J.D.; MROZ, Z.; REBEL, J.M.; TER HUURNE, A.A. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Current Issues Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2002.

KARIMI, A.; YAN, F.; COTO, C.; PARK, J.H.; MIN, Y.; LU, C.; GIDDEN, J.A.; LAY JUNIOR, J.O.; WALDROUP, W. Effects of level and source of oregano leaf quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 19, p. 137-145, 2010.

KIDD, M.T.; POTE, L.M.; KEIRS, R.W. Lack of interaction between dietary threonine and *Eimeria acervulina* in chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 12, p. 124-129, 2003.

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

KIPPER, M.; ANDRETTA, I.; LEHNEN, C.R.; LOVATTO, P.A.; MONTEIRO, S.G. Meta-analyses of the performance variation in broilers experimentally challenged by *Eimeria* spp. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 196, n. 1/2, p. 77-84, 2013.

KNARREBORG, A.; ENGBERG, R.M.; JENSEN, S.K.; JENSEN, B.B. Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6425– 6428, 2002.

KNARREBORG, A.; SIMON, M.A.; ENGBERG, R.M.; JENSEN, B.B.; TANNOCK, G.W. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 5918–5924, 2002.

KOUTSOS, E.A.; ARIAS, V.J. Intestinal ecology: interactions among the gastrointestinal tract, nutrition and the microflora. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v. 15, p. 161-173, 2006.

LA-ONGKHUM, O.; PUNGSUNGVORN, N.; AMORNTHIEWAPHAT, N.; NITISINPRASERT, S. Effect of the antibiotic avilamycin on the structure of the microbial community in the jejunal intestinal tract of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, n. 7, p. 1532-1538, 2011.

LAPARRA, J.M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, Philadelphia, v. 61, n. 3, p. 219-225, 2010.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; JANG, S.I.; LI, G.; LEE, S.; LILLEHOJ, E.; SIRAGUSA, G.R. Effect of *Bacillus*-based direct-fed microbial on *Eimeria maxima* infection in broiler chickens. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 105-110, 2010.

LEE, S.H.; LILLEHOJ, H.S.; DALLOUL, R.S.; PARK, D.W.; HONG, Y.H.; LIN, J.J. Influence of *Pediococcus*: based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 63-66, 2007.

LEE, S.H.; LILLEHOJ, H.S.; JANG, S.I.; LEE, K.W.; BRAVO, D.; LILLEHOJ, E.P. Effects of dietary supplementation with phytonutrients on vaccine-stimulated against infection with *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 181, n. 2/4, p. 97-105, 2011.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, London, v. 444, p. 1022–1023, 2006.

LILLEHOJ, H. S. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. **International Journal of Parasitology**, Philadelphia, v. 28, n. 7, p. 1071-1081, 1998.

LILLEHOJ, H.S.; MIN, H.S.; DALLOUL, A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune response to *Eimeria*. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 4, p. 611-623, 2004.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003.

MARTINOVA-VAN KLEY, M.A.; OVIEDO-RONDON, E.O.; DOWD, S.E.; HUME, M.; NALIAN, A. Effect of *Eimeria* infection on cecal microbiome of broilers fed essential oils. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 11, n. 12, p. 747-755, 2012.

MICHENER, H.D.; ANDERSEN, A.A. Protection of lupulon and humulon by ascorbic acid. **Science**, New York, v. 110, n. 2846, p. 68–69, 1949.

MIKKELSEN, L.L.; VIDANARACHCHI, J.K.; OLNOOD, C.G.; BAO, Y.M.; SELLE, P.H.; CHOCT, M. Effect of potassium diformate on growth performance and gut microbiota in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. **British Poultry Science**, London, v. 50, n. 1, p. 66-75, 2009.

MIZOBUCHI, S.; SATO, Y. Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 49, n. 2, p. 399-403, 1985.

MOUNTOZOURIS, K.C.; PARAKEVAS, V.; TSIRSIKOS, P.; PALAMIDI, I.; STEINER, T.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Assessment of phytogenics feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. **Animal feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 168, n. 3/4, p. 223-231, 2011.

NAIDOO, V.; McGAW, L.J.; BISSCHOP, S.P.R.; DUNCAN, N.; ELOFF, J.N. The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 153, n. 3/4, p. 214-219, 2008.

NIEWOLD, T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**. Champaign, v. 86, n. 4, p. 605-609, 2007.

ORENGO, J.; BUENDIA, A.J.; RUIZ-IBANEZ, M.R.; MADRID, J.; DEL RIO, L.; CATALÁ-GREGORI, P.; GARCÍA, V.; HERNANDEZ, F. Evaluating the efficacy of cinnamaldehyde and *Echinacea purpurea* plant extract in broilers against *Eimeria acervulina*. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 185, n. 2/4, p. 158-163, 2012.

OVIEDO-RONDON, E.O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 209-225, 2009.

OVIEDO-RONDÓN, E.O.; HUME, M.E.; HERNÁNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, C. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 5, p. 854–860, 2006.

OVIEDO-RONDON, E.O.; HUME, M.E.; BARBOSA, N.A.; SAKOMURA, N.K.; WEBER, G.; WILSON, J.W. Ileal and caecal microbial populations in broilers given specific essential oil blends and probiotics in two consecutive grow-outs. **Avian Biology Research**. London, v. 3, n. 4, p. 157–169, 2010.

PEDROSO, A.A. Microbiota do trato digestório: transição do embrião ao abate. In: CONFERÊNCIA FACTA, 2011, Santos. **Anais...** Campinas: Facta, 2011. p. 123-130.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 14, n. 2, p. 32–237, 2005.

PEDROSO, A.A.; MAURER, J.; CHENG, Y.; LEE, M. D. Remodeling the intestinal ecosystem toward better performance and intestinal health. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v. 21, p. 432-443, 2012.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R.; RACANICCI, A.M.C.; LONGO, F.A.; SORBARA, J.O.B. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 4, p. 747–752, 2006.

PEINADO, M.J.; RUIZ, R.; ECHAVARRI, A.; RUBIO, L.A. Garlic derivative PTS-O is effective against broiler pathogens in vivo. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 2148–2157, 2012.

PEINADO, M.J.; RUIZ, R.; ECHAVARRI, A.; ARANDA-OLMEDO, I.; RUBIO, L.A. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. **Animal feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 181, n. 1/4, p. 87-92, 2013.

PELICIA, V.C.; ZAVARIZE, K.C.; DUCATTI, C.; STRADIOTTI, A.C.; PEZZATO, A.C.; ARAUJO, P.C.; MITUO, M.A.O.; MADEIRA, L.A.; SARTORI, J.R. Nucleotídeos na dieta de frangos de corte e seus efeitos sobre a taxa de turnover da mucosa intestinal antes e após lesões causadas por coccidiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1652-1659, 2011.

PERCIA, M.E.; YOUNG, E.L.; UTTERBACK, P.L.; PARSONS, C.M. Effects of dietary ingredients and *Eimeria acervulina* infection on chick performance, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 48-55, 2006.

REMMAL, A.; ACHAHBAR, S.; BOUDDINE, L.; CHAMI, N.; CHAMI, F. *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 182, n. 2/4, p. 121-126, 2011.

RINTTILA, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites: implications for broiler chicken health and performance. **Journal Applied Poultry Research**. Champaign, v. 22, n. 3, p. 647-658, 2013.

RIZZO, P.V.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M.C.; TRALDI, A.B.; SILVA, C.S.; PEREIRA, P.W.Z. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 801-807, 2010.

ROBYN, J.; RASSCHAERT, G.; HERMANS, D.; PASMANS, F.; HEYNDRICKX, M. Is allicin able to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in broilers when added to drinking water? **Poultry Science**, Champaign, v. 92, n. 5, p. 1408-1418, 2013.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.

RUIZ, R.; GARCIA, M.P.; LARA, A.; RUBIO, L.A. Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. **Veterinary Microbiology**, Philadelphia, v. 144, n. 1/2, p. 110–117, 2010.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**: user's guide; version 9.3 ed. Cary, 2012.

SCHEURER, W.; SPRING, P.; MAERTENS, L. Effect of 3 dietary phytogetic products on production performance and coccidiosis in challenged broiler chickens. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v. 22, n. 3, p. 591-599, 2013.

SHIRLEY, M.W.; SMITH, A.L.; BLAKE, D.P. Challenges in the successful control of the avian coccidian. **Vaccine**, Philadelphia, v. 25, n. 30, p. 5540-5547, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. cap. 18, p. 387-416.

SIRAGUSA, G.R.; HAAS, G.J.; MATTHEWS, P.D.; SMITH, R.J.; BUHR, R.J.; DALE, N.M.; WISE, M.G. Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Oxford, v. 61, n. 4, p. 853–858, 2008.

STANLEY, D.; DENMAN, S.E.; HUGHES, R.J.; GEIER, M.S.; CROWLEY, T.M.; CHEN, H.; HARING, V.R.; MOORE, R.J. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 96, n. 5, p. 1361-1369, 2012.

TIIHONEN, K.; KETTUNEN, H.; BENTO, M.H.L.; SAARINEN, M.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SCHULZE, H.; RAUTONEN, N. The effect of feeding essential oils on broilers performance and gut microbiota. **British Poultry Science**, London, v. 51, n. 3, p. 381-391, 2010.

TILLMAN, G.E.; HAAS, G.J.; WISE, M.G.; OAKLEY, B.; SMITH, M.A.; SIRAGUSA, G.R. Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 77, n. 2, p. 395–403, 2011.

TOROK, V.A.; HUGHES, R.J.; MIKKELSEN, L.L.; PEREZ-MALDONADO, R.; BALDING, K.; McALPINE, R.; PERCY, N.J.; OPHEL-KELLER, K. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiota in broilers chickens across various feeding trials. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 17, p. 5868-5878, 2011.

VAN CLEEMPUT, M.; CATTOOR, K.; DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; DE KEUKELEIRE, D.; HEYERICK, A. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. **Journal Natural Product**, Columbus, v. 72, n. 6, p. 1220–1230, 2009.

VELKERS, F.C.; SWINKELS, W.J.C.; REBEL, J.M.J.; BOUMA, A.; DAEMEN, A.J.J.M.; KLINKENBERG, D.; BOERSM, W.J.A.; STEGEMAN, J.A.; JONG, M.C.M.; HEESTERBEEK, J.A.P. Effect of *Eimeria acervulina* infection history on the immune response and transmission in broilers. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 173, n. 3/4, p. 184-192, 2010.

WEI, C.; MORRISON, M.; YU, Z Bacterial census of poultry intestinal microbiome. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, n. 3, p. 671-683, 2013.

YANG, Y.; IJI, P.A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v. 65, p. 97-114, 2009.

YEGANI, M.; KORVER, D.R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 10, p. 2052-2063, 2008.

YUN, C.H.; LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P. Intestinal immune response to coccidiosis. **Developmental and Comparative Immunology**. Philadelphia, v. 24, n. 2-3, p. 303-324, 2000.

ZHOU, H.; GONG, J.; BRISBIN, J.T.; YU, H.; SANEI, B.; SABOUR, P.; SHARIF, S. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 12, p. 2541–2549, 2007.