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

**Ambiência, bem-estar e microbiota intestinal de aves poedeiras no sistema
free-range livre de antibióticos**

Gislaine Goretti Romano

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Engenharia de Sistemas
Agrícolas

**Piracicaba
2017**

Gislaine Goretti Romano
Bacharel em Zootecnia

Ambiência, bem-estar e microbiota intestinal de aves poedeiras no sistema free-range livre de antibióticos

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **KÉSIA OLIVEIRA DA SILVA MIRANDA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Engenharia de Sistemas Agrícolas

Piracicaba
2017

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

Romano, Gislaine Goretti

Ambiência, bem-estar e microbiota intestinal de aves poedeiras no sistema free-range livre de antibióticos / Gislaine Goretti Romano. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2017.

163 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Bem-estar animal 2. Comportamento 3. Densidade de simbioses 4. Galinhas poedeiras I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico....

À minha inesquecível e amada mãe Maria Conceição Romano (*in memoriam*), pela sabedoria em me educar, por seus gestos solidários, pela sua espiritualidade, pelo amor e carinho de mãe que soube me proteger e me ensinar os limites da vida, por ter investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento capaz de transformar as pessoas sempre para melhor. Sua dolorosa perda durante a caminhada nesse projeto transformou-se em motivação, encorajada pelas palavras e lições de vida que ela deixou. Mãe, você é presença marcante em minha vida. Obrigada por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim e por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas. Sua memória é exemplo de força-guerreira e renascer constante. Agradeço a você por ter sido minha mãe. Esta vitória é nossa!!!!

Te amarei eternamente!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu mestre, amigo, companheiro, e que em todos os momentos esteve ao meu lado, me ensinado como caminhar, levantar nas quedas e valorizar as vitórias que passamos na vida.

Ao meu querido pai Imi Romano pelo afeto, incentivo, e ensinamentos fundamentais em minha formação pessoal e profissional. Eu o admiro muito!

À minha irmã Giselda, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre.

Ao meu marido Fábio, que esteve o tempo todo ao meu lado incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grata por cada gesto de carinho, cada sorriso e palavras de apoio.... Obrigada meu amor!

Ao meu bebezinho (in memoriam) que infelizmente não chegou a vir no mundo, mas me ensinou a valorizar pequenas coisas da vida. Filho (a) saiba que você foi muito amado!!

À Profa. Késia Oliveira da Silva Miranda, muito obrigada pela oportunidade concedida, confiança permanente, pelos ensinamentos, pela amizade construída nestes anos e acima de tudo a professora é exemplo de humildade.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli, por disponibilizar seu laboratório para os experimentos de qPCR e tudo mais que precisei, além das conversas técnicas e científicas.

À Dra. Carolina Reigada e ao Prof. Dr. Idemauro pelas orientações nas análises estatísticas.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao Departamento de Engenharia de Biosistemas e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas Agrícolas, pelas oportunidades que em ofereceram durante minha trajetória na pesquisa.

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado.

Ao Centro de Pesquisa Mokiti Okada (CPMO) e a Korin Agropecuária pelo financiamento da pesquisa e por abrir suas portas para a execução da mesma, proporcionando um ambiente de trabalho o qual fortaleceu meu crescimento profissional e pessoal.

Ao coordenador geral do CPMO Luiz Carlos Demattê Filho pela confiança e apoio prestado durante a realização deste trabalho.

Agradeço de forma especial aos amigos Giuliana Castro Magalhaes e Jorge Konrado Xavier pela amizade, receptividade, convivência e ajuda constante despendida nesta pesquisa.

À minha irmãzinha do coração, sempre presente Flávia Rafaela Santos Silva pela cumplicidade e inesquecíveis momentos compartilhados. Você é uma pessoa incrível! Obrigada por me escutar e enxugar minhas lágrimas nos momentos difíceis.

À minha grande amiga Larissa Carrion Carvalho, pela amizade verdadeira, competência e profissionalismo. AMIGA você foi um anjo que caiu do céu, sua ajuda foi fundamental para que este trabalho fosse concretizado.

À minha segunda família em Piracicaba: Graziela, Rogério, Pedro, Karina, Marcelo, Luiz Henrique, Juliana, Enrico, Catatau, Geraldo e Tânia.

Ao meu filhinho de quatro patas Mutley, amor da minha vida, companheiro durante a elaboração deste trabalho, pelo amor incondicional, pelas lições decorrentes de nosso relacionamento.

Aos meus amigos queridos amigos Mariana, Fabinho, Eduardo e Taciana pelos momentos de descontração e muitas risadas.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Chegará o dia em que todo homem conhecerá o íntimo de um animal. E neste dia, todo o crime contra o animal será um crime contra a humanidade.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
REFERÊNCIAS	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 BEM-ESTAR ANIMAL.....	17
2.2 INFLUÊNCIA DA AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO ZOOTÉCNICA	19
2.3 TERMORREGULAÇÃO E CONFORTO TÉRMICO EM AVES.....	20
2.3.1 Termorregulação	20
2.3.2 Produção e perda de calor	22
2.3.3 Zona de conforto térmico	24
2.4 SISTEMAS DE CRIAÇÃO NA AVICULTURA	27
2.5 COMPORTAMENTO ANIMAL	30
2.6 MICROBIOTA INTESTINAL DAS AVES DE PRODUÇÃO.....	34
2.6.1 Papel da flora bacteriana	39
2.6.2 Características das principais bactérias presentes em aves	41
2.6.2.1 <i>Lactobacillus</i> spp.....	41
2.6.2.2 <i>Bacteroides</i> spp.	41
2.6.2.3 <i>Bifidobacterium</i> spp.....	41
2.6.2.4 <i>Fusobacterium</i> spp.	42
2.6.2.5 <i>Salmonella</i> spp.....	42
2.6.2.6 <i>Clostridium</i> spp.	43
2.6.2.7 <i>Campylobacter</i> spp.....	43
2.6.2.8 <i>Escherichia coli</i>	44
2.7 EFEITOS DOS ANTIBIÓTICOS NA DIETA ANIMAL.....	44
Referências	45
3 AMBIÊNCIA DE AVES POEDEIRAS MANTIDAS NO SISTEMA FREE-RANGE LIVRE DE ANTIBIÓTICOS: UMA ABORDAGEM DO BEM-ESTAR	59
RESUMO	59
ABSTRACT	59
3.1 INTRODUÇÃO	60

3.2 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.2.1 Local experimental e tipologia da instalação	61
3.2.2 Animais utilizados na pesquisa e período experimental	63
3.2.3 Manejo das aves	63
3.3 ETAPAS DA PESQUISA	64
3.3.1. Avaliação do microclima na instalação	64
3.3.2 Avaliação das propriedades física da cama e ninhos	66
3.3.2.1 Determinação da umidade da cama e ninhos	66
3.3.2.2 Determinação do pH da cama e ninhos	67
3.3.2.3 Determinação da amônia liberada pela cama.....	67
3.3.3 Avaliação de pododermatite.....	67
3.3.4 Análise das condições de empenamento	68
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.4.1 Parâmetros climáticos	69
3.4.2 Avaliação da qualidade do ar e propriedades físicas da cama e ninhos.....	73
3.4.3 Avaliação de pododermatite.....	75
3.4.4 Condições de empenamento.....	77
3.5 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	80
4 PADRÃO COMPORTAMENTAL E FISIOLÓGICO DE GALINHAS POEDEIRAS MANTIDAS NO SISTEMA FREE-RANGE LIVRE DE ANTIBIÓTICOS.....	89
RESUMO	89
ABSTRACT.....	89
4.1 INTRODUÇÃO.....	90
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	91
4.2.1 Local e período experimental.....	91
4.2.2 Instalações, aves e manejo	91
4.2.3 Etapas da pesquisa	93
4.2.3.1 Avaliações dos parâmetros fisiológicos	93
4.2.3.1.1 Frequência respiratória.....	93
4.2.3.1.2 Temperatura superficial	93
4.2.3.2 Avaliações comportamentais	94
4.2.3.3 Análise de corticosterona	97
4.2.3.4 Análises estatísticas.....	98

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
4.3.1 Temperatura superficial e frequência respiratória	98
4.3.2 Expressões comportamentais.....	102
4.3.3 Quantificação dos níveis de corticosterona	122
4.4 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS	124
5 DINÂMICA POPULACIONAL DE SIMBIONTES INTESTINAIS EM GALINHAS POEDEIRAS NO SISTEMA FREE-RANGE LIVRE DE ANTIBIÓTICOS	133
RESUMO	133
ABSTRACT	133
5.1 INTRODUÇÃO	134
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	136
5.2.1 Coleta das amostras	136
5.2.2 Preparo das amostras e extração de DNA genômico.....	137
5.2.3 Quantificação do DNA genômico	138
5.2.4 Iniciadores específicos utilizados	138
5.2.5 Clonagem e otimização das condições de reações de PCR quantitativo	140
5.2.6 Análises estatísticas	142
5.2.6.1 Análise descritiva	142
5.2.6.2 Modelagem estatística	142
5.2.6.3 Análise intragrupos via modelos lineares generalizados mistos	142
5.2.6.4 Análise intergrupos via Equações de Estimação Generalizadas (EEG)	144
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
5.4 CONCLUSÕES	156
REFERÊNCIAS	156
APÊNDICE	163

RESUMO

Ambiência, bem-estar e microbiota intestinal de aves poedeiras no sistema free-range livre de antibióticos

O bem-estar animal pode influenciar o sistema produtivo na avicultura de postura. Sendo assim, o sistema free-range ou “ao ar livre” sem o uso de antibióticos surge como uma alternativa aos sistemas confinados. Espera-se que esse sistema torne-se cada vez mais difundido em atenção à demanda do mercado consumidor e bem-estar animal. Neste estudo, são abordados a influência da ambiência nas características qualitativas da cama aviária e ninhos, qualidade do ar, padrões fisiológicos e comportamentais, e avaliação da microbiota intestinal de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range sem o uso de antibióticos. O estudo foi conduzido em um galpão comercial de galinhas poedeiras da linhagem Lohmann Brown. O período experimental correspondeu da 18^a a 24^a semanas de idade, para as avaliações relacionadas à ambiência, parâmetros fisiológicos e comportamentais. Para a estimativa da densidade bacteriana intestinal, as aves foram avaliadas durante o período de produção dos ovos, correspondendo à idade de pré-pico de postura (13^a semana), pico de postura (24^a semana) e pós-pico de postura (63^a semana). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Constatou-se que as condições climáticas foram favoráveis, ou seja, as aves permaneceram dentro da zona de termoneutralidade e na faixa de conforto térmico ideal. Resultados referentes à amônia volatilizada foram satisfatórios, assim como a umidade da cama e ninhos. Não houve incidência de pododermatite e as condições de empenamento das aves permaneceram íntegras nas regiões avaliadas. As avaliações comportamentais das aves demonstraram que as mesmas estavam em totais condições de bem-estar animal, ademais os níveis de corticosterona foram significativamente inferiores. Em relação ao estudo da microbiota intestinal das aves, as análises revelaram diferentes padrões de densidade dos simbiontes em relação às regiões estudadas. A população das bactérias benéficas foi significativamente maior em comparação as bactérias patogênicas. Os simbiontes intestinais estudados demonstraram crescimento diferencial ao longo do período estudo. Diante do exposto, podemos reportar que o sistema free-range sem o uso de antibióticos apresentou qualidade de vida às aves poedeiras no que tange o bem-estar animal.

Palavras-chave: Bem-estar animal; Comportamento; Galinhas poedeiras; Saúde intestinal; Sistema free-range

ABSTRACT

Ambience, welfare and gut microbiota of laying hens in the free-range antibiotics-free system

Animal welfare quality may affect egg laying livestock. Thus, the antibiotics-free free-range rearing system (AFFRS) came to light as an alternative to conventional production systems. Furthermore, it is expected AFFRS become more and more widespread as a response to consumer demand and animal welfare rules. In here, we aimed to evaluate the influence of the ambience on the avian litter and nests, air quality, bird physiology and behavioral patterns, and their intestinal microbiota as well. The study was carried out using Lohmann Brown laying hens breed of the 18th to the 24th weeks-old kept in a commercial shed, and the environmental, physiological and behavioral parameters were evaluated. Additionally, gut microbiota was estimated by using hens of three different egg production cycles. The first cycle was represented by grower hens with 13th weeks of age as their reproductive organs were developing (i.e. early cycle), followed by 24th weeks-old grower hens (high egg production cycle), and 63th weeks-old grower cycle hens (late egg-laying cycle). Water and feed were supplied *ad libitum*. Data demonstrated birds were in optimal thermal comfort and the volatilized ammonia concentration remained at very low rates, as well as the bed and nest moisture levels. There was no incidence of pododermatitis and the conditions of feathering of the birds remained intact. Animal welfare conditions were optimal as demonstrated through behavioral data and corticosterone levels. Furthermore, gut microbiota densities were different between target symbiont-groups of the same gut region and among different gut segments investigated. Beneficial bacteria densities were significantly higher than pathogenic bacteria and gut symbionts showed differential growth curve throughout the studied period. Thus, our results demonstrated that the AFFRS met the laying hen's welfare quality rules and can be considered a good alternative rearing system to the egg production industry.

Keywords: Animal welfare; Behavior; Free-range system; Intestinal health; Laying hens

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é a atividade agropecuária que mais evoluiu nas últimas décadas, principalmente devido à grande competitividade pela conquista de mercado em relação às demais atividades (TINÔCO, 2001; PATRICIO et al., 2012). Em vista disso, pesquisadores têm sido levados a desenvolver novas pesquisas com o objetivo de aperfeiçoar estudos na área de nutrição, manejo, bem-estar, genética e sanidade, visando um alto desempenho zootécnico com baixos custos de produção.

Entretanto o sistema de confinamento intensivo em criação de aves poedeiras vem sendo questionado quanto ao bem-estar, qualidade de vida e saúde desses animais (TACTACAN et al., 2009), além da sustentabilidade do negócio, sob a alegação de causadores de graves prejuízos ao conforto físico e à expressão de comportamentos naturais destes animais (BAXTER, 1994).

Campanhas movidas por diferentes segmentos e a pressão crescente de organizações não governamentais sensibilizaram a opinião pública em muitos países, o que gerou mudanças consideráveis nas leis (ALVES et al., 2007). Nesse sentido, a Comunidade Europeia decretou uma diretiva (1999/74/CE) que proíbe o uso de gaiolas convencionais desde o ano de 2012. Essa situação aponta para o cenário em que as aves começam a ser criadas em gaiolas que promovam o bem-estar, ou ainda, soltas em galpões com acesso às áreas livres (LAY et al., 2011). As exigências propostas pela União Europeia poderá colocar o Brasil em ótima situação quanto ao que se refere à exportação de ovos, uma vez que o país dispõe de uma vasta extensão territorial, clima favorável, baixo custo de produção e disponibilidade de mão-de-obra favorecendo a conquista de novos mercados (SOUZA, 2007). Porém, no Brasil, para que o bem-estar seja entendido e valorizado do ponto de vista ético e econômico, faz-se necessário informar e conscientizar a população, para promover a discussão sobre o tema e sua inserção nas cadeias produtivas. Logo, a busca por modelos de criação que possam garantir o bem-estar animal, os índices produtivos, a saúde e a qualidade do produto final, leva ao desenvolvimento de sistemas alternativos de produção (HOOREBEKE; IMMERSEEL; SCHULZ, 2010).

Nesse contexto, o sistema free-range ou “ao ar livre” sem o uso de antibióticos surge como uma alternativa aos sistemas confinados (DEMATTE FILHO, 2014). Assim, espera-se que esse sistema torne-se cada vez mais difundido em atenção à demanda do mercado consumidor, regulamentações ambientais e de bem-estar animal (KNIEREM, 2006).

No sistema free-range as aves são criadas livres e em contato direto com o solo, promovendo benefícios diretos e indiretos sobre o bem-estar dos animais por permitir ao animal mostrar padrões de comportamentos naturais como ciscar, voar, forragear, etc. (COOPER; ALBENTOSA, 2003). Outro diferencial nesse sistema de criação é que as aves poedeiras não recebem antibióticos ou quimioterápicos, assegurando maior qualidade aos consumidores e isenção de resíduos nos ovos.

Importante ressaltar que a máxima produtividade avícola tem relação direta com a microbiota intestinal e as associações que ocorrem entre esses microrganismos e o hospedeiro, pois qualquer fator de estresse leva a uma alteração negativa da microbiota (JEURISSEN et al., 2002). Essas interações contribuem para a manutenção da saúde, para a homeostase da população intestinal e para a integridade física do intestino do hospedeiro (YEGANI; KORVER, 2008). A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro, podendo ser modulada pela composição da dieta (TANNOCK, 1998). A população microbiana normal do trato intestinal age no hospedeiro como uma barreira de defesa, através da criação de um meio ambiente nocivo aos microrganismos patogênicos (MILES, 1993; OVIEDO-RONDÓN, 2009).

Com base no que foi exposto, o estudo do bem-estar de aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos, assim como a avaliação da densidade bacteriana da microbiota intestinal, torna-se uma importante ferramenta para fornecer respostas a questões básicas da etologia, aliadas a saúde e a eficiência produtiva desses animais.

Portanto, o objetivo geral dessa pesquisa foi mensurar as implicações do sistema de criação free-range livre de antibióticos em galinhas poedeiras, sendo os objetivos específicos:

- Estudar a influência e os efeitos dos fatores ambientais no sistema de produção;
- Avaliar o estresse das aves poedeiras a partir de análises fisiológicas e comportamentais;
- Quantificar a densidade bacteriana presente na microbiota intestinal das aves.

A hipótese do referente estudo consiste em quais os benefícios que esse sistema alternativo de criação implicará no bem-estar animal e saúde das aves poedeiras.

Referências

- ALVES, S.P.; SILVA, I.J.O.; PIEDADE, S.M.S. Avaliação do bem-estar de aves poedeiras comerciais: efeitos do sistema de criação e do ambiente bioclimático sobre o desempenho das aves e a qualidade de ovos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p.140-143, 2007.
- BAXTER, M.R. The welfare problems of laying hens in battery cages. **Veterinary Record**, United States, v. 134, p. 614-619, 1994.
- COOPER, J.J.; ALBENTOSA, M.J. Behavioural priorities of laying hens. **Avian and Poultry Biology Reviews**, London, v. 14, p. 127-149, 2003.
- DEMATTE FILHO, L.C. **Sistema agroalimentar da avicultura fundada em princípios da Agricultura Natural: multifuncionalidade, desenvolvimento territorial e sustentabilidade**. 2014. 260 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo, Piracicaba, 2014.
- HOOREBEKE, S.V.; IMMERSEEL, F.V.; SCHULZ, J. Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for Salmonella infections in laying hens flock housed in conventional and alternative systems. **Preventive Veterinary Medicine**, London, v. 94, p. 94-100, 2010.
- JEURISSEN, S.H.M.; LEWIS, F.; VAN DER KLIS, J.D.; MROZ, Z.; REBEL, J.M.J.; HUURNE, A.A.H.M. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Journal of Intestinal Microbiology**, Chicago, v. 3, p. 1-14, 2002.
- KINIEREM, U. Animal welfare aspects of outdoor runs for laying hens: a review. **Wageningen Journal of Life Sciences**, United States, v. 54, n. 2, p. 133-145, 2006.
- LAY, D.C.; FULTON, R.M.; HESTER, P.Y.; KARCHER, D.M.; KJAER, J.B.; MENCH, J.A.; MULLENS, B.A.; NEWBERRY, R.C.; NICOL, C.J.; SULLIVAN, N.P.O.; PORTER, R.E. Hen welfare in different housing systems. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 278-294, 2011.
- MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: ALTECH BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, Florida, 1993. **Proceedings...** p.133-50.
- 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.
- PATRICIO, I.S.; MENDES, A.A.; RAMOS, A.A.; PEREIRA, D.F. Overview on the performance of Brazilian broilers (1990 to 2009). **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 4, n. 4, p. 233-238, 2012.
- SOUZA, B.B. Adaptabilidade e bem-estar em animais de produção. **Infobibos**, Campina Grande, v. 1, p. 11-14, 2007.

TACTACAN, G.B.; GUENTER, W.; LEWIS, N.J.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C.; HOUSE, J.D. Performance and welfare of laying hens in conventional and enriched cages. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 698-707, 2009.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, Champaign, v. 8, p. 527-533, 1998.

TINÔCO, I.F.F. Industrial aviculture: new concepts of materials, conceptions and constructive techniques available for brazilian poultry houses. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 123-131, 2001.

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

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bem-estar animal

No século XVII o filósofo Descartes afirmou: “um animal não é nada além de uma máquina”. Ele via apenas o estímulo e a resposta como se as respostas dos animais fossem reações automáticas e necessárias ao estímulo, negando a capacidade dos animais aprenderem e agirem de forma independente e inteligente (MAYR, 1974). Hoje certamente esta afirmação não seria aceita no meio científico e ético, e seria motivo de pressão pública. O entendimento do bem-estar animal exige conhecimento sobre a espécie em questão e suas relações com o meio. A abordagem multidisciplinar é necessária, integrando conceitos, além da definição clara e inequívoca do que é bem-estar animal (COSTA, 2002).

No início da década de 90, diversos autores (FRIEND, 1990; BROOM, 2011) alertavam para a necessidade de o sistema educacional ensinar os princípios básicos do bem-estar animal, e também, preparar os estudantes para as mudanças nos sistemas de produção e nos hábitos de consumo que ocorreriam nas décadas seguintes. O termo bem-estar refere-se ao estado do indivíduo frente ao ambiente em que vive. Animais de produção têm necessidades comportamentais específicas e são capazes de alterar seu comportamento para se adaptarem ao ambiente em que vivem (BROOM, 2011).

O bem-estar animal tem sido definido de várias formas. A maioria das definições concorda que o bem-estar ocorre quando os animais estão em harmonia com seu ambiente. No entanto, algumas definições enfatizam que sempre haverá desafios para os animais em qualquer ambiente, e que o bem-estar ocorre quando os animais são capazes de lidar com esses desafios. Ainda existe muita discussão se o bem-estar deve ser definido em última análise, em termos de sentimentos (fome, dor, medo, frustração e prazer), ou em termos de funcionamento biológico fáceis de serem mensurados. Portanto, o conceito de bem-estar mais difundido refere-se por meio das "Cinco Liberdades", que foram apresenta das pela primeira vez no Relatório de Brambell. Estas "liberdades" foram depois adaptadas pelo Farm Animal Welfare Council, mantendo-se hoje ainda como uma referência para o estudo e avaliação de bem-estar em animais de produção (FAWC, 2011). As "Cinco Liberdades" identificam os elementos que determinam a percepção de bem-estar pelo próprio animal e definem as condições necessárias para promover esse estado (Figura 1).

Figura 1 - As cinco liberdades adaptadas por Farm Animal Welfare Council (2011)

A Organização Mundial de Saúde Animal (OFFICE INTERNATINAL DES EPIZOOTIES - OIE), em fevereiro de 2004, salientou a importância de padrões de bem-estar animal a serem adotados por todos os países exportadores de produtos de origem animal, afetando principalmente os países que não se adequem. Isso gerou a atual diferenciação das exigências de bem-estar entre os países e fez com que alguns deles como a Dinamarca, Suíça e Suécia, apresentassem legislações mais rígidas que os demais países (HELESKI; MERTING; ZANELLA, 2004; BAYVEL; RAHAMAN; GAVINELLI, 2005). A Suíça possui uma das mais antigas e rígidas legislações de bem-estar animal que inclui princípios básicos para o tratamento dos animais nos regulamentos "Swiss Federal Act on Animal Protection" de 1978 e o "Swiss Animal Protection Ordinance" de 1981. Já em 1992, o país aboliu o uso das gaiolas para poedeiras, sendo pioneiro em uma das mais polêmicas questões sobre o bem-estar na avicultura, que é a criação em baterias de gaiolas. Na União Europeia, a Diretiva 88/166/EEC (CCE, 1986) especificou um tamanho mínimo para as gaiolas, e a atual Diretiva

(1999/74/CE) que estabelece os padrões mínimos para o bem-estar de aves poedeiras nos diversos sistemas de criação, banuiu o sistema de criação em gaiolas a partir de 2012 (HELESKI; MERTING; ZANELLA, 2004; ROJAS; STUARDO; BENEVIDES, 2005).

2.2 Influência da ambiência na produção zootécnica

A ambiência é descrita como o ramo em que são estudadas as formas de promover a adequação do ambiente ao conforto animal. Baseada no contexto ambiental em que estes animais estão presentes, analisa as características de meio ambiente em função da zona de conforto das diferentes espécies, sempre considerando a fisiologia de regulação da temperatura interna atuante na espécie em questão (ESMAY, 1969). A ambiência encontra-se associada ao bem-estar animal, uma ciência que tem agregado à sua estrutura a obrigação de investigar e estabelecer, além dos fatores pertinentes à primeira, formas de minimizar condições estressantes como densidade animal, ausência de poluição sonora e ambiental, além de propiciar conforto e possibilitar ao animal expressar seu comportamento natural (BROOM, 2011; EWING; LAY; VON BORELL, 1999; PARANHOS DA COSTA, 2000).

A avicultura e a suinocultura são as atividades pecuárias em que os sistemas mais comuns de criação ocorrem em reduzidas áreas, de forma extremamente intensiva e em ambientes artificiais, que possuem características muito díspares aos ambientes originais desses animais. Essas atividades necessitam, portanto, de um controle eficaz do ambiente, sendo de fundamental importância o emprego da ambiência nas instalações, e agregado a ela, o emprego de sistemas que promovam o bem-estar animal (CURTIS, 1983).

O ambiente é subdividido pelos diferentes fatores físicos, químicos e biológicos e pode interagir de forma direta e indireta sobre os animais. Dentre os fatores ambientais, aspectos relativos ao ambiente térmico devem ser destacados, uma vez que estes interferem de forma extremamente significativa no desenvolvimento produtivo animal. O ambiente térmico animal é caracterizado pela temperatura, umidade relativa, vento e radiação. Segundo Santos et al. (2010), esses elementos não atuam isoladamente, eles apresentam efeito conjunto que pode ser traduzido por uma temperatura ambiental efetiva.

Contudo, o efeito do ambiente adequado ao animal, talvez não se reflita em melhora significativa na produção, pois há fatores como a genética, a nutrição e a sanidade do rebanho a serem considerados. Na maioria dos casos, o impacto do ambiente na produção animal tem mostrado pontos de estrangulamento no que diz respeito ao projeto das instalações. As construções rurais do futuro devem prever muito mais que o simples fornecimento de sombra

para a criação dos animais, pois as demandas de bem-estar inerentes ao consumidor aumentaram consideravelmente, exigindo novos conceitos de projeto que atendam as exigências ambientais (CLARK, 1981).

2.3 Termorregulação e conforto térmico em aves

2.3.1 Termorregulação

Entende-se por termorregulação o processo de controle da temperatura corporal de um animal em um ambiente qualquer, quando há um gradiente de temperatura, ou seja, quando o animal não se encontra em termoneutralidade (WILLMER; STONE; JOHNSTON, 2000; DAWSON; WHITTOW, 2000). Atualmente a criação de aves comerciais, em especial frangos de corte e aves poedeiras, possuem maior eficiência nutricional e desempenho produtivo. Porém, apesar desse potencial para produtividade, mostra-se susceptível a um grande número de variáveis e, dentre elas, a ambiental. As variáveis ambientais tanto podem ter efeitos positivos como negativos sobre a produção das aves. Assim, altas temperaturas reduzem o consumo de alimento prejudicando o desempenho e a produção de ovos. Já, baixas temperaturas, podem melhorar o ganho de peso (em frangos de corte), mas em função de elevada conversão alimentar (MELTZER, 1983; CHWALIBOG; EGGUM, 1989, YAHAV et al., 1995).

Nesse sentido, a condição ambiental deve ser manejada, na medida do possível, para evitar efeitos negativos sobre o desempenho produtivo das aves, com consequente efeito sobre a produção animal (carne e ovos) e a incidência de doenças metabólicas. Assim para se obter melhor desempenho produtivo na avicultura, deve-se estar atento à interação entre o animal e o ambiente, a fim de que o custo energético dos ajustes fisiológicos sejam os menores possíveis (LIN et al., 2005). As aves são animais homeotérmicos, ou seja, possuem a capacidade de manter a temperatura do núcleo corporal dentro de limites relativamente estreitos, mesmo que a temperatura ambiental flutue e que sua atividade varie intensamente. Do ponto de vista termodinâmico, significa que as aves estão em troca contínua de calor com o meio, entretanto, este processo só se mostra eficiente quando a temperatura ambiente se encontra dentro de certos limites de conforto térmico (ABREU; ABREU, 2011).

O sistema homeostático de controle é um conjunto de componentes interligados que atuam para manter relativamente constante um parâmetro físico ou químico do organismo da ave. Por exemplo, a temperatura corporal das aves oscila entre 39-41,1°C, apesar de a

temperatura ambiente variar em grande magnitude (LIN, et al., 2004). Considerando que a temperatura ambiental seja elevada (estresse calórico) haverá uma reduzida perda/produção de calor da ave para o meio ambiente. Portanto, quanto mais elevada à temperatura ambiente menor será a perda calórica. Nesse sentido, a ave deverá acionar mecanismos homeostáticos de controle de temperatura corporal caso deseje que a temperatura seja mantida a 39-41,1°C e o animal não desenvolva hipertermia. Assim esse ajuste de temperatura é papel do sistema homeostático de controle da ave e, quando acionado, manterá a temperatura central dentro dos limites toleráveis de temperatura, permitindo a constância do meio interno e o perfeito funcionamento dos sistemas. No caso de frangos de corte e galinhas poedeiras, esse ajuste permitirá melhor desempenho produtivo, ou seja, maior anabolismo, e consequentemente, maior produção (ARJONA; DENBOW; WEAVER, 1988). O sistema de termorregulação nas aves é baseado em quatro diferentes unidades funcionais: **a)** receptor; **b)** controlador; **c)** efector e **d)** sistema passivo (Figura 2).

Figura 2 - Interação entre ambiente e ave. Fonte: Adaptado de Furlan et al., (2008)

A percepção dos estímulos pelos receptores e sua integração com o sistema nervoso induz a ativação dos mecanismos controladores da temperatura corporal. A participação dos sistemas efetores induz as respostas para a manutenção da homeotermia. Pode-se dizer, portanto, que o controle da temperatura nas aves é feito com base no balanço de duas variáveis: uma associada às respostas desencadeadas pelo aumento e, a outra, pela redução da temperatura (VAN KAMPEN, 1971; NOLAN; WEATHERS; STURKIE, 1978). Assim assume-se a existência das duas populações neuronais no hipotálamo. Os neurônios responsivos ao calor, que são ativados quando a temperatura corporal aumenta, induzem o animal a ter respostas de perda de calor; e os neurônios responsivos ao frio que são ativados, quando a temperatura corporal está baixa, induzem a resposta de conservação de calor (KIOUKIA-FOUGIA et al., 2002).

O conceito de centro de referência (*set-point* termorregulador) é fundamental, pois nas aves os sistemas homeostáticos de controle de temperatura sempre atuam com uma referência fixa e resistem a quaisquer alterações. Isso significa que a ave tem o ponto de referência de 41,1°C e esse não são variáveis, com todos os sistemas funcionando para manter a temperatura corporal nesse valor (ABU-DIEYEH, 2006). Portanto, o *set-point* termorregulador reside na influência recíproca dos sensores de frio e de calor sobre o sistema controlador da temperatura corporal. Assim, quando as atividades dos neurônios responsivos ao calor e ao frio se igualam, a produção será igual à perda de calor e a temperatura será mantida estável (FURLAN; MACARI, 2008). Esse ponto de atividade é denominado de *set-point*, que, no caso das aves domésticas, está em torno de 41,1°C.

Nesse sentido, a manutenção da temperatura corporal das aves é função de mecanismos de produção e perda de calor. Portanto, à medida que a temperatura corporal se eleva, durante o estresse calórico, processos fisiológicos são ativados com a finalidade de: **a)** aumentar a dissipação de calor e **b)** reduzir a produção metabólica de calor. Durante o estresse pelo frio, é observado efeito oposto com redução na dissipação de calor e aumento na produção de calor (FREEMAN, 1988).

2.3.2 Produção e perda de energia térmica

Para aumentar a dissipação de calor dos tecidos, de onde ele é produzido para a superfície do corpo onde ele é dissipado, a ave utiliza mecanismos de perda de calor sensível e latente. A dissipação de calor sensível ocorre por intermédio dos mecanismos não evaporativos, ou seja: radiação, convecção e condução (Figura 3).

Logo, a ave para aumentar a dissipação, procura maximizar a área de superfície corporal, “agachando”, mantendo as asas afastadas do corpo, induzindo piloereção e aumentando o fluxo sanguíneo para os tecidos periféricos não cobertos com pena (pé, crista e barbela). Dessa forma, a ave faz com que haja uma troca de calor sensível para o meio ambiente, pois o sangue possui, de forma similar à da água, grande capacidade transportar calor dos tecidos até a superfície corporal, a fim de que haja troca de calor com o meio ambiente (LIN et al., 2006).

Figura 3 - Mecanismos de transmissão de energia térmica da ave para o meio. Fonte: Adaptado de Campell e Reece (2010)

Estudos mostram a interação entre a temperatura ambiente e a temperatura corporal e da pele. Richards (1976), variando a temperatura ambiente de 0°C a 40°C, encontrou um aumento na temperatura corporal de 40,9°C a 43,7°C, respectivamente. Zhou e Yamamoto (1997) verificaram um aumento de 3°C (41°C a 44°C) na temperatura corporal, enquanto a temperatura da pele aumentou 6°C (37°C a 43°C) em frangos submetidos ao estresse calórico (36°C/3horas). Assim, a variação da temperatura da pele, durante o estresse calórico, evidencia um aumento no fluxo sanguíneo para a superfície da ave para dissipação do calor, o qual é refletido pela maior temperatura da pele (SHINDER et al., 2007). Porém, o inverso também é verdadeiro: uma redução no fluxo sanguíneo cutâneo diminui a perda de calor.

Yahav et al. (1998) sugeriram que, com o objetivo de reduzir a perda de calor, aves submetidas a baixas temperaturas ambiente sofrem alterações hemodinâmicas, bem como, vasoconstrição periférica.

O resfriamento evaporativo respiratório constitui-se em um dos mais importantes meios de perda de calor das aves em temperatura elevadas. Logo, as aves têm a capacidade de aumentar a frequência respiratória em até 10 vezes e, dessa forma, aumentar a perda de calor no trato respiratório (YAHAV et al., 2004). É sabido que para evaporar 1 g de água são necessárias 550 calorias; assim, quanto maior a frequência respiratória das aves, maior a quantidade de calor é dissipada para o meio ambiente (YAHAV et al., 2004). Entretanto, o aumento na frequência respiratória gera mais energia pela contração da musculatura, produz mais calor e pode determinar quadros severos de hipertermia (DONKOH, 1989; TETTER, 1994). Além disso, como consequência da elevada frequência respiratória, a ave pode desenvolver distúrbio do equilíbrio ácido-base chamado de alcalose respiratória (aumento do pH do sangue). Assim, a perda de calor através do processo evaporativo respiratório representa uma importante via de dissipação de calor em altas temperaturas ambiente, pois a perda sensível fica muito reduzida; no entanto, a mesma pode gerar quadros indesejáveis, como a alcalose respiratória (YAHAV et al., 1995).

2.3.3 Zona de conforto térmico

O conforto animal, até alguns anos atrás, era visto como um problema secundário, tanto do ponto de vista ecológico quanto produtivo. Acreditava-se que o desconforto seria resolvido com o uso de condicionamento artificial, sem considerar os custos e problemas de implantação de um sistema. Porém, nas últimas décadas, a preocupação com bem-estar animal vem crescendo notoriamente, sendo um dos assuntos mais discutidos, principalmente quando associado às respostas fisiológicas como indicadores de conforto térmico e ambiental (VITORASSO; PEREIRA, 2009; TINOCO et al., 2014). Desde então, a indústria avícola passou a buscar na ambiência a possibilidade de melhoria no conforto e desempenho animal como forma de manter o bem-estar das aves, assim como a competitividade de mercado. Dessa forma, os fatores ambientais passaram a ser considerados de grande importância no processo de produção, dando início a vários estudos que culminaram na proposta e criação de índices do ambiente térmico de produção (OGUNTUNJI et al., 2008).

A zona de conforto térmico ou termoneutra define-se como sendo uma faixa de temperatura ambiente na qual a taxa metabólica é mínima e a homeotermia (pontos C e C') é

mantida com menos gasto de energético (Figura 4). Assim, na zona de conforto térmico a fração de energia metabolizável utilizada para termogênese é mínima e a energia líquida de produção é máxima (FUQUAY, 1981; CURTIS, 1983; LE DIVIDICH et al., 1998). Ressalva-se que a zona termoneutra depende de uma série de variáveis e, dentre elas, poderiam ser citadas algumas intrínsecas da ave: isolamento térmico, isolamento externo, mecanismos autonômicos de vasomotricidade dentre outros. Fatores extrínsecos também podem alterar as características da zona termoneutra, como a energia da dieta, ventilação ambiente e características físicas das instalações (piso, telhado, etc.).

Figura 4 - Variações da temperatura corporal de um animal homeotérmico em função da temperatura ambiente. Fonte: Adaptado de Müller (1989) e Baêta e Souza (1997)

Na figura acima, ilustra as variações da temperatura corporal de um animal homeotérmico. De acordo com o gráfico, existe uma faixa de temperatura ambiente em que o metabolismo do animal é mínimo, não tendo esse a necessidade de produzir ou perder calor corporal, sendo essa faixa denominada de zona de termoneutralidade. Nessa faixa os animais se encontram em conforto térmico e podem expressar seu máximo potencial genético. A zona de termoneutralidade é limitada em ambos os extremos pelos pontos B e B'. A zona de conforto térmico varia de acordo com a espécie e dentro da mesma espécie animal, ou seja, é limitada pelas temperaturas efetivas ambientais dos pontos A e A'. Nas aves, essa faixa de temperatura pode mudar de acordo com sua constituição genética, idade, sexo, tamanho corporal, peso, dieta, estado fisiológico, variação da temperatura ambiente, radiação, umidade

e velocidade do ar (FURTADO; AZEVEDO; TINÔCO, 2001). Para aves em fase de produção, a zona termoneutra situa-se em torno entre 20 e 24°C (CHEPETE; XIN, 2000; YANAGI et al., 2011, FERREIRA, 2005).

Em situações de frio, de A até B os animais realizam ajustes comportamentais para conservar o calor corporal, aumentando ao máximo o isolamento térmico corporal. As normas de conduta do animal neste ambiente será dirigir-se ao sol, lugares secos e pisos aquecidos, refugiar-se de vento, agrupar-se, diminuir a ingestão de água e aumentar o consumo de alimentos. Auxiliando o processo, ocorrem vasoconstrição periférica e piloereção. Ainda assim, nesta fase, não há aumento na produção de calor pelos animais (YANAGI et al., 2011).

A temperatura ambiente efetiva do ponto B é a Temperatura Crítica Inferior (TCI). Abaixo desta, o animal aciona seus mecanismos termorregulatórios para incrementar a produção e retenção de calor corporal, compensando a dissipação para o ambiente. Importante ressaltar que a alimentação produz uma mudança na temperatura correspondente ao ponto B. Um bom nível alimentar abaixa, notadamente, a temperatura correspondente a este ponto. Nesta faixa de temperatura ambiental efetiva que vai até o ponto C, os animais realizam processos termogênicos.

Em um primeiro momento, eles realizam tremores musculares, que são lentamente substituídos por uma resposta em longo prazo, consistente de uma termogênese sem tremores, gerada pelo sistema neuro-hormonal e caracterizada por elevação dos níveis de hormônios tireoidianos, catecolaminas e glicocorticoides, para aumentar a oxidação de substratos, produzindo maior quantidade de calor, atuando no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado. Abaixo da TCI pode haver mudanças no desempenho produtivo e conversão alimentar dos animais, afetando a produção (TURNPENNY et al., 2000; TINÔCO, 2001).

No limite inferior (ponto C), fica a temperatura crítica inferior absoluta, na qual a taxa metabólica é máxima (ponto máximo de compensação metabólica). Se a temperatura ambiental efetiva continuar decrescendo, o animal entra na zona de frio intolerável. Nesta faixa de frio intenso, a taxa metabólica é levemente acima da máxima e pode ser mantida por um período curto, pois a taxa de produção de calor não consegue compensar a dissipação para o ambiente. Este fato provoca a queda na temperatura corporal do animal e, consequentemente, a sua morte (ponto D). A duração do estresse de frio pode alterar a zona de conforto do animal: quando o estresse é agudo (queda de temperatura em curto espaço de tempo), ocorre aumento na produção de calor; quando é crônico, o animal se adapta ao frio aumentando o isolamento térmico interno (epiderme e tecido subcutâneo) e externo (pele, pêlo e ar), economizando energia no processo termorregulatório (DONALD, 1998).

Em situações de calor, ao contrário do que ocorre no frio, de A' até B' os animais precisam realizar ajustes comportamentais para dissipar o excesso de calor corporal, diminuindo o isolamento térmico animal. Suas normas de conduta neste ambiente será procurar sombra, lugares molhados e pisos frios, expor-se ao vento, evitar se agrupar, diminuir o consumo de alimentos e consequentemente aumentar a ingestão de água. Em regiões quentes (estresse crônico), os animais diminuem a gordura subcutânea e, também, a cobertura de pelos. Auxiliando o processo, intensificam-se os mecanismos de troca latente (insensível), que requerem maior gasto de energia, sendo aumento na frequência respiratória e sudorese. Os animais que não apresentam glândulas sudoríparas funcionais recorrem a ofegação (aumento da frequência do ritmo respiratório) como principal mecanismo para dissipação do excesso de calor corporal nesta faixa de temperatura. Neste ambiente ocorre, ainda, a vasodilatação periférica, mas, mesmo assim, nesta fase, não há diminuição na produção de calor (PROSSER et al., 1952; FINDLAY; BEAKLEY, 1954).

A temperatura efetiva do ponto B' é a Temperatura Crítica Superior (TCS). Acima desta, o animal aciona seus mecanismos termorregulatórios para diminuir a produção e incrementar a dissipação de calor corporal. Nesta faixa de temperatura ambiental efetiva que vai até o ponto C, os animais realizam processos de termólise caracterizados por diminuição da taxa metabólica, dos níveis de hormônios tireoideanos e catecolaminas e elevação dos níveis plasmáticos de glicocorticoides. Apesar disso, o nível de calor tende a aumentar, especialmente pelo efeito de *Van't Hoff*.

Acima da TCS, o animal não consegue regular por muito tempo a homeostase térmica, e a temperatura corporal se eleva. No estresse agudo, o animal aumenta a frequência respiratória, e em estresse crônico ele reduz sua taxa metabólica, ocorrendo redistribuição anatômica da gordura depositada. A partir do ponto C' (temperatura crítica superior absoluta), os ajustes termorregulatórios não são suficientes, e se apresenta uma hipertemia acentuada que, se persistir por algumas horas, leva o animal à morte por alteração dos mecanismos fisiológicos vitais (WILLMER; STONE; JOHNSTON, 2000).

2.4 Sistemas de criação na avicultura

A maioria dos sistemas de produção de aves, no Brasil, os fatores climáticos, ou seja, o ambiente térmico é pouco gerenciado, o micro ambiente para a produção e bem-estar das aves, nem sempre é compatível com as necessidades fisiológicas das mesmas.

Na avicultura de corte e postura o sistema de criação intensivo é o mais empregado. O regime intensivo causa estresse intenso, tendo como consequência respostas fisiológicas e comportamentais que podem causar sérios problemas à saúde e bem-estar dos animais (SILVA et al., 2003). Os animais criados em sistemas intensivos são impedidos de realizar diversas atividades naturais ao seu comportamento, como os hábitos de ciscar, empoleirar-se e tomar banho de terra. Devido a isto, vários comportamentos anormais são verificados como agressões por meio de bicadas e canibalismo e por estes motivos, o sistema de criação semi-intensivo é considerado como uma alternativa. De acordo com Santos et al. (2010), o sistema, informalmente conhecido como "tipo caipira", trata-se de um modelo de baixa densidade, crescimento lento e abate tardio. Os animais têm acesso direto ao pasto, consumindo insetos e forragens típicas da sua cadeia alimentar. Isto lhe confere textura, cor e sabor diferenciado, e com menos gordura na carcaça. Mostra-se ainda como um sistema menos agressivo ao meio ambiente e às aves, afetando positivamente na saúde e bem-estar animal (BLOKHUIS et al., 1998; VON BORELL; VAN DEN WEGHE, 1999).

Ainda na avicultura outra questão a ser abordada é a determinação do melhor sistema de produção utilizando-se em conjunto artifícios que venham promover o bem-estar animal. Santos et al. (2010) avaliando o comportamento de frangos de corte em sistema de produção caipira utilizando diferentes materiais de enriquecimento ambiental definiram quatro módulos de produção. No primeiro, os animais só tinham acesso a piquete, no segundo, acesso a piquete com poleiro, no terceiro, acesso a piquete e sombreamento artificial e no quarto, acesso a piquete com poleiro e sombreamento artificial. Ao final do experimento foi verificado que as aves submetidas ao módulo de produção com acesso a piquete com poleiro e sombreamento artificial tiveram melhor oportunidade de expressar seus comportamentos naturais e de explorar o ambiente externo, potencializando o bem-estar.

Na avicultura de postura o sistema convencional (baterias em gaiolas) ainda é o mais adotado, principalmente no Brasil. Esse sistema é caracterizado por um conjunto de gaiolas distribuídas em vários níveis, sendo compatíveis com alta tecnologia, como, arraçamento automático, esteiras para a retirada de fezes e programação eletrônica de coleta de ovos. As gaiolas dispensam o uso da cama, proporcionando benefícios para as aves e os funcionários, pois eliminam o contato com as fezes, evitando a coccidiose e verminoses, e melhoram o ambiente de trabalho, com a diminuição dos níveis de poeira e amônia (CUNNINGHAM; MAULDIN, 1996; ROCHA; LARA; BAIÃO, 2008). Previnem o consumo dos ovos pelas galinhas, já que estes rolam para o aparador após a postura, ficando longe do alcance das mesmas. No entanto, gaiolas comumente utilizadas representam uma preocupação para o

bem-estar, pois impedem as aves de apresentarem comportamentos naturais, causando estresse. O limitado espaço ainda restringe a movimentação e as atividades das aves, contribuindo para a “osteoporose por desuso”, que torna o osso mais frágil e susceptível a fraturas dolorosas (WHITEHEAD, 2004; ROCHA; LARA; BAIÃO, 2008).

Vista as limitações demonstradas pelo atual sistema em relação ao bem-estar desses animais, a legislação internacional de bem-estar de aves poedeiras estabeleceu um conjunto de mudanças, nas instalações e no manejo das aves, visando à melhor adaptação aos novos requisitos do mercado, surgindo assim, os sistemas alternativos para a criação de aves poedeiras, tais como o de “gaiolas enriquecidas”, e os de semi-confinamento, que poderão proporcionar às aves uma área com cama e poleiro, além de disponibilizar ninho para a postura (WHITEHEAD, 2004; BARBOSA FILHO et al., 2007).

No sistema de gaiolas enriquecidas, as mesmas podem conter poleiros, ninhos, banhos de areia e dispositivos de desgaste das unhas. Segundo Roll et al. (2009), os resultados de pesquisas indicam que os poleiros em gaiolas enriquecidas são benéficos às aves, pois aumentam o repertório de comportamentos e a resistência dos ossos, diminuindo problemas de fadiga de gaiola e osteoporose. Porém, em alguns casos a presença de poleiros pode ser prejudicial devido o aumento dos desvios no esterno, em função da pressão que estes exercem sobre o peito das aves enquanto elas descansam, e em maior probabilidade de ocorrência de problemas de inflamação plantar, em função de um estado higiênico insatisfatório dos poleiros. Em relação aos dados de desempenho alguns autores sugerem uma leve redução no consumo de ração e no peso dos ovos sem afetar a conversão alimentar (TACTACAN et al., 2009). Em relação aos ninhos e banhos de areia, pouco é informado. Quanto aos dispositivos de desgaste das unhas destacou-se a melhora no estado sanitário das poedeiras. O encurtamento das unhas pode ter efeitos positivos sobre alguns aspectos da sanidade e/ou bem-estar, como a diminuição dos enganches nas gaiolas, bem como a diminuição nas quebras de unhas e arranhões entre aves, melhorando a conservação da plumagem (ROLL et al., 2008).

No sistema de criação semi-confinado os animais são mantidos em galpões com piso, similares aos galpões empregados para a criação de frangos de corte, ou podem ter parte do piso perfurado com grades que separam as aves de suas fezes. Pode apresentar um ou mais níveis, que devem conter cama, ninhos e poleiros. Por apresentarem maior espaço, e a possibilidade das aves desenvolverem suas atividades normais, este pode ser demonstrado como a mais eficiente alternativa quando o emprego do bem-estar animal integra o modelo produtivo.

Barbosa Filho et al. (2007), comparando o sistema confinado em gaiolas e semi-confinado com cama e ninho em relação ao comportamento animal, verificaram a ocorrência dos comportamentos naturais e de conforto no sistema de criação em cama com ninho, possibilitando melhores condições de bem-estar para as aves, quando comparado com o sistema de criação em gaiolas, onde a expressão desses comportamentos praticamente não ocorreu. Verificaram também, que em condições de estresse térmico, o sistema de criação em cama foi o que se mostrou mais adequado sob o ponto de vista de redução dos efeitos do estresse causados pelos altos valores das variáveis ambientais.

Ainda dentro do sistema de criação semi-confinado, existe um “novo” modelo para a criação de poedeiras, o sistema “free-range”, ou criação “ao ar livre”. Essa alternativa, aos sistemas confinados, tende a se tornar cada vez mais comum e acessível ao produtor à medida que aumentam, gradativamente, o mercado consumidor, as regulamentações ambientais e de bem-estar animal. Neste sistema as poedeiras são criadas sem gaiolas, em contato direto com o chão promovendo banhos de areia, acesso direto a ninhos, poleiros dispostos por todo aviário em diferentes alturas favorecendo a movimentação das aves e área aberta com pasto (RODENBURG et al., 2003; BRACKE; HOPSTER, 2006).

Ressalta-se que este sistema possui um potencial benéfico sobre o bem-estar das aves, uma vez que não reprimem seus instintos e permite-lhes mostrar padrões de comportamento naturais, como movimentar-se, ciscar, abrir as asas, limpar as penas, pastejar, etc. (MAHBOUB; MÜLLER; BORELL, 2004; MIAO; GLATZ; RU, 2005; BESSEI, 2010).

2.5 Comportamento animal

Entende-se por comportamento os movimentos que o animal faz mesmo aqueles que levam à imobilidade absoluta. Contudo, tal entendimento é incompleto, afinal, além dos movimentos, os animais apresentam outras manifestações (mudanças de cor, produção de odores, emissão de sons, etc.) que também deveriam ser caracterizados como comportamentos (SCOTT, 2005). A definição formulada por Kandel (1976) atende a essa expectativa, caracterizando o comportamento como toda resposta muscular ou secretória observada por mudanças no ambiente interno e externo dos animais (Figura 5).

De maneira concisa e objetiva, pode-se considerar o comportamento como toda manifestação ou resposta de um efator que possa ser medida. A restrição imposta pela necessidade da medida visa a limitar o alcance da definição a situações concretas, pois se deve reconhecer que ainda há muito que aprender sobre as relações dos animais com seu

ambiente, sendo ainda presentes várias especulações sobre os animais e seus comportamentos (DAWKINS, 2004; BROOM, 2011).

Figura 5 - Esquema para o entendimento integrado dos estímulos e mecanismos envolvidos na expressão do comportamento, caracterizando que os organismos, de maneira geral, estão no ambiente e fazem parte dele. Fonte: Adaptado de Paranhos da Costa (2002)

Porém, trata-se de uma definição ampla, incluindo desde as simples contrações musculares e secreções, até categorias mais complexas do comportamento sexual e a comunicação por exemplo. Tal amplitude se presta justamente para mostrar o grau de complexidade que se enfrenta ao trabalhar com comportamento animal. Em particular, deve ser notado que o comportamento de um animal não é a soma de manifestações isoladas e estanques, mas um conjunto solidário e interdependente dessas em todos os níveis do organismo (FRASER, 2008).

Entretanto, a partir de certas propriedades anatômicas e fisiológicas dos organismos que o comportamento (conforme supracitado) é possível. Deve-se reconhecer que na série filogenética, há uma enorme variação na complexidade do comportamento, desde atos simples, breves e repetidos (estereotipados) até sequencias de atos complexos e variáveis (DETHIER; STELLAR, 1973).

No início da filogenia, um dado estímulo desencadeia uma resposta específica ou vários estímulos desencadeiam várias respostas (em série ou não). Tais respostas, geralmente invariáveis, apresentam-se da mesma forma desde a primeira vez que foram apresentadas, sendo, portanto inatas, ou seja, herdadas geneticamente.

Os comportamentos inatos se caracterizam por não serem modificados pela experiência. Os animais estariam potencialmente prontos para apresenta-los desde o nascimento, independente das experiências que venham a viver. São, portanto, típicos da espécie e conferem valor adaptativo, pois são produtos da evolução (ALCOCK, 1998). Mais tarde, em filogenia, o comportamento é variável, mais possível de modificações. Desenvolve ajustes de caráter individual por meio do processo de aprendizagem, caracterizando os comportamentos adquiridos ou aprendidos (GRIER, 1984).

Nesse caso, o comportamento ganha plasticidade, sendo moldado pelas experiências vividas por cada indivíduo, possibilitando uma melhor adaptação dos animais às condições não previstas do ambiente (Tabela 1). As aves caracterizam-se pela capacidade de apresentarem uma série de comportamentos que podem ser classificados como inatos ou aprendidos. Compõem um conjunto que permite a ação de mecanismos adaptativos, apropriados às condições ecológicas em que vivem (SHETTLEWORTH, 2001).

Tabela 1 - Caracterização dos comportamentos inatos e aprendidos

Categorias	Subcategorias	Definição	Mecanismos Envolvidos	Características Básicas	Funções Predominantes
INATO	Taxias	Orientação na qual os movimentos são continuamente guiados por um estímulo externo específico.	Automatismo	Automático	Manutenção da homeostase
	Reflexos	Quando um estímulo induz a uma resposta automática, involuntária e fixa.	Arco reflexo	Ato involuntário	Manutenção da homeostase
	Comportamentos motivados	Quando a expressão de um comportamento depende de uma condição especial do ambiente interno do organismo.	Mecanismo de liberação inato	Padrões fixos de ação	Manutenção individual e social
APRENDIDO	Aquisição de habilidades	Integração de componentes separados do comportamento em padrões eficientes que se tornam constantes na forma e poucos sujeitos ao controle da consciência.	Mecanismos de aprendizagem	Formação de associações	Variação para a adaptação (plasticidade)
	Habituação	Quando um indivíduo cessa de responder a um dado estímulo, quando este é apresentado rapidamente, não sendo associado a qualquer tipo de recompensa ou punição. Ocorre em relação a estímulos inócuos ao organismo.	Mecanismos de aprendizagem	Formação de associações	Variação para a adaptação (plasticidade)
	Aprendizado latente*	Aprendizado sem recompensa evidente.	Mecanismos de aprendizagem	Formação de associações	Variação para a adaptação (plasticidade)
	Condicionamento clássico	Formação ou fortalecimento de uma associação entre um estímulo previamente significativo e outro previamente neutro.	Mecanismos de aprendizagem	Formação de associações	Variação para a adaptação (plasticidade)
	Condicionamento operante	Fortalecimento de uma resposta ativa (operante) pela apresentação de uma recompensa se, e somente se, a resposta ocorrer.	Mecanismos de aprendizagem	Formação de associações	Variação para a adaptação (plasticidade)
	<i>Imprinting</i> (estampagem)	Processo que envolve a formação de um vínculo social primário durante períodos sensíveis no desenvolvimento.	Mecanismos de aprendizagem	Formação de associações	Variação para a adaptação (plasticidade)
	<i>Insight*</i> (aprendizado por compreensão)	Meio de resolver um problema através da combinação de duas ou mais experiências isoladas, formando uma nova resposta, que é eficaz.	Mecanismos de aprendizagem	Formação de associações	Variação para a adaptação (plasticidade)

(*) Ocorrência duvidosa em galináceos

Fonte: Adaptado de Paranhos da Costa (2002)

2.6 Microbiota intestinal das aves de produção

A complexa comunidade de microrganismos residindo ou passando pelo trato intestinal é definida como microbiota intestinal (GERRITSEN et al., 2011). Centenas de espécies distintas de bactérias e outros microrganismos habitam o trato gastrointestinal dos animais (Figura 6). O número de células microbianas que estão presentes no trato intestinal suplanta o número de células presentes no corpo do animal hospedeiro (FUJIMURA et al., 2014). Em vista disso, o desempenho e a saúde das aves de produção estão intimamente relacionados à microbiota intestinal.

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, como a produção de dissacaridases no epitélio intestinal (KAZAKOVA et al., 2006; SOMMER; BÄCKHED, 2013), motilidade do trato (BARBARA et al., 2005; HUSEBYE et al., 2001), resistência contra patógenos intestinais (BUCHON et al., 2009), afeta os metabolismos lipídico e energético, e a absorção de glicose pelo hospedeiro, além de fornecer uma fonte extra de vitaminas e minerais (HRDINA et al., 2009; KAU et al., 2011; GIELDA; DI-RITA, 2012).

A microbiota também é capaz de regular a eficiência absorptiva, a maturação intestinal, a resposta imune, o tempo de permanência do bolo alimentar no trato e o aproveitamento de alguns nutrientes pouco digestíveis pelas enzimas endógenas animal (AMIT-ROMACH; SKLAN; UNI, 2004). Entretanto, as interações desses mecanismos promovem um equilíbrio da microbiota intestinal, o que trará diversos benefícios ao animal. Logo, o desequilíbrio microbiano pode contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas e imunológicas (JEURISSEN et al., 2002). Ainda dentro do contexto existem as bactérias patogênicas, o qual os efeitos consistem em: diarreia, infecções, distúrbios hepáticos, carcinogênese, putrefação intestinal, redução da digestão e absorção de nutrientes (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004; MAIORKA et al., 2003). Nos últimos anos tem-se tornado frequente 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 microrganismos 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 Gedek (1989), existe uma microbiota natural no trato gastrointestinal de difícil definição e composta de aproximadamente 400 espécies em equilíbrio entre si e com o hospedeiro. A presença desta microbiota intestinal normal, em equilíbrio, é tão necessária quanto benéfica para o bem-estar do animal. Estima-se que 90% da microbiota sejam constituídas por bactérias (aeróbicas/anaeróbicas) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.), incluídas as bactérias exclusivamente aeróbicas como os *Bacteroides* spp, *Fusobacterium* spp. e *Eubacterium* spp. Os 10% restantes dessa microbiota são constituídos de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas, a *Escherichia coli*, *Escherichia enterococci*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Blastomyces* spp.

Figura 6 - Microhabitats microbianos. (A) Comunidade aderida à camada do muco; (B) Comunidade dispersa no lúmen, formado por bactérias livres ou aderidas às partículas de alimento. Fonte: Furlan et al., (2008)

A distribuição da população bacteriana no trato gastrointestinal de aves comerciais é qualitativa e quantitativa. Após a eclosão, o trato gastrointestinal é rapidamente colonizado (MARCH, 1979), e estende-se desde o trato superior (papo, proventrículo e moela) até a cloaca. Aproximadamente 85% dos organismos isolados do duodeno, jejuno, íleo e ceco são Gram-positivos. A maioria das bactérias do intestino delgado são anaeróbias, ao passo que as bactérias anaeróbias estritas incluem a maior parte da microbiota, tanto do cólon quanto do ceco (SALANITRO et al., 1978; LANCINI, 1994).

Normalmente a microbiota se encontra em equilíbrio e qualquer mudança nessa proporção é potencialmente causadora de baixo desempenho produtivo e infecções intestinais. Apesar de muitos relatos na literatura descreverem as espécies que compõem a microbiota de diferentes segmentos do trato gastrointestinal, é improvável a existência de uma microbiota típica, uma vez que a composição do alimento, condições ambientais (temperatura e estresse) e presença de patógenos afetam de maneira diferente as espécies de bactérias (GABRIEL et al., 2006).

No intestino delgado possui menor quantidade de microrganismos em virtude das condições desfavoráveis predominantes. 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 microrganismos elevem-se de maneira expressiva, com predominância de populações anaeróbias estritas (GONG et al., 2007).

Salanitro et al. (1978) descreveram que no intestino delgado os microrganismos predominantes são *Escherichia coli* e espécies de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus*, além das espécies de *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Gemminger formicilis* e *Fusobacterium* (Figura 7). No estudo de Engberg et al. (2000) verificou-se um aumento no número de bactérias do duodeno para o jejuno e desse para o íleo de frangos de corte. Nos cecos, o tempo de permanência da ingesta é mais longo e as condições são mais estáveis para a proliferação microbiana, resultando numa maior contagem de bactérias em relação ao intestino delgado (ENGBERG et al., 2000).

Figura 7 - Distribuição e taxa da população bacteriana presentes ao longo do trato gastrointestinal de frangos, descritas por Gong et al., (2007), Saengkerdsut et al., (2007) e Qu et al., (2008). As populações de fungos e vírus não foram apresentadas. Fonte: Adaptado de Yeoman et al., (2012)

Dentre os principais gêneros de bactérias que são identificados na microbiota cecal das aves, observam-se invariavelmente a presença de *Bacterioides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Citrobacter* spp., *Clostridium* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Ruminococcus* spp., *Serratia* spp., *Veillonella* spp., *Streptococcus* spp., dentre outros (SILVA; ALVES FILHO, 2000).

De acordo com Mead (2000) as bactérias estritamente anaeróbias são predominantes no íleo e ceco; porém, muitas anaeróbias facultativas também estão presentes. A população Gram-positiva é dominante, consistindo de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Clostridium*. As Gram-negativas encontradas são *Bacterioides*, *Acetovibrio*, *Selenomonas*, *Fusobacterium* e espécies de *Escherichia coli*.

A microbiota presente no trato gastrointestinal (TGI) das aves é extremamente complexa e dinâmica, e contém aproximadamente 10^{11} UFC/g de conteúdo intestinal, de um incontável número de espécies distintas de bactérias (PELICANO et al., 2007). O desenvolvimento desta flora microbiana inicia-se logo após a eclosão dos pintos. De 2-4 dias pós-eclosão são encontradas principalmente cepas de *Streptococcus* e *Enterobacteria*, e, após uma semana, *Lactobacillus* predominam no intestino delgado e se mantêm ao longo da vida do animal, e microrganismos anaeróbios, como *Escherichia coli*, *Bifidobacteria* e *Bacteroides*, predominam nos cecos (AMIT-ROMACH; SKLAN; UNI, 2004). Em animais adultos, predominam as bactérias Gram-positivas, sendo 90% da flora composta por bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp.) e os 10% restantes desta flora são constituídos de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, dentre as quais se tem: *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp, *Blastomyces* spp. (LEE et al., 2002).

As bactérias que colonizam o trato gastrointestinal no início tendem a persistir ao longo da vida da ave, passando a compor a microbiota intestinal. No entanto, a formação da microbiota ocorre imediatamente após o nascimento das aves e aumenta durante as primeiras semanas de vida, até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbias (BERTECHINI, 1998; SILVA; ALVES FILHO, 2000).

De acordo com Mead (2000), uma população bacteriana similar à do adulto está presente em duas semanas no intestino delgado e em cerca de 30 dias no ceco, tempo superior ao que ocorreria em condições naturais. Os segmentos do trato gastrointestinal possuem funções e características morfológicas específicas. Dessa forma, é esperado que os microrganismos presentes sejam específicos em cada local de colonização. Cada espécie colonizará o segmento ao qual estiver mais adaptada (SIMON; GORBACH, 1984).

Entre os fatores que influenciam a colonização e a diversidade da população bacteriana, incluem-se dieta, taxa de passagem, secreção de ácido clorídrico, barreira mucosa, imunoglobulinas, auto regulação da população bacteriana, agentes antimicrobianos endógenos e exógenos. Além das espécies bacterianas que estão sempre presentes no trato gastrointestinal, existem as que estão em menor número, como as contaminantes e as transeuntes, oriundas da cavidade oral e da dieta. (SAVAGE, 1977).

Segundo Ferreira e Kussakawa (1999) em condições normais, ocorrem no organismo um equilíbrio natural entre os microrganismos patogênicos, úteis e neutros. Entretanto, se ocorrer alterações no ambiente e for eliminada parte de bactérias úteis e neutras, essas serão substituídas por bactérias resistentes ou menos desejáveis que se multiplicasse em seu lugar,

sendo capazes de produzir sintomas clínicos, como redução do ganho de peso e da eficiência alimentar do animal (MARCH, 1979). Assim, a inexistência de microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal do animal permite a proliferação de outros microrganismos que são favoráveis ao seu desempenho (VANBELLE; TELLER; FOCANT, 1990).

Jernigan e Miles (1985) descreveram que existe uma relação do bom funcionamento do trato gastrointestinal e o desempenho do animal e que pode estar ligado à manutenção do número específico de bactérias benéficas que irá habitá-lo, fazendo com que o animal tenha um adequado balanço da microbiota. No entanto, se microrganismos ou substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal forem adicionados à dieta, o animal estará continuamente recebendo um auxílio para o estabelecimento dessa população microbiana e que afetam benéficamente o animal hospedeiro.

2.6.1 Papel da microbiota intestinal

O conhecimento da composição da microbiota intestinal é importante para saber como as bactérias intestinais estão interagindo com as outras e com o hospedeiro. Muitas vezes a descrição simples dos componentes da microbiota não oferece ideia da execução desta (CUNNINGHAM, 1992; APAJALAHTI; KETTUNES; GRAHAM, 2004).

Quando a ave apresenta uma flora intestinal equilibrada (Figura 8), seja em termos de tipos bacterianos, ou em quantidade e distribuição no trato gastroentérico, pode-se observar um efeito simbiótico com efeito positivo para o desempenho zootécnico (APAJALAHTI; KETTUNES; GRAHAM, 2004).

Figura 8 - Efeitos das bactérias benéficas no trato intestinal Fonte: Adaptado de Furlan et al., (2008)

Com relação à digestão, a flora bacteriana contribui com a fermentação cecal dos componentes fibrosos, induzindo a produção de ácidos graxos voláteis que podem suprir de 5% a 10% das necessidades energéticas das aves. De uma forma indireta, a presença de uma flora bacteriana equilibrada, particularmente no ceco, contribui para a exclusão e/ou competição com bactérias patogênicas como *E. coli*, *Clostridium* e *Salmonella* (SAVAGE, 1977). Importante considerar que, quando se fala em equilíbrio da flora bacteriana, significa balancear a população de biotas do intestino delgado e ceco, que excluem competitivamente as bactérias patogênicas e controlam a população de bactérias da flora que têm efeito competidor ou negativo (KORSHUNOV et al., 1985; SELL, 1996; BLIKSLARGER; ROBERTS, 1997).

Portanto, o desequilíbrio da microbiota intestinal com alteração na população de microrganismos é chamado de disbiose e ocorre em condições diversas como estresse, jejum alimentar ou hídrico prolongado e infecções virais, provocando desequilíbrio da flora com proliferação de microrganismos indesejáveis como *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonellas*, *Campylobacter*, *Staphylococcus* e *Blastomyces* (VISEK, 1978; MILES, 1993; TANNOCK, 1998; HUME et al., 2003).

2.6.2 Características das principais bactérias presentes em aves

2.6.2.1 *Lactobacillus* spp.

O gênero *Lactobacillus* spp. corresponde um bacilo ou cocobacilo gram-positivo que faz parte da microbiota do trato gastrointestinal tanto de animais quanto de humanos, sendo amplamente distribuídos na natureza e adicionados a muitos produtos alimentícios pelo seu valor como probiótico (STEPHENSON; MOORE; ALLISON, 2010). Em aves com microbiota intestinal já estabelecida, podemos encontrar: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* predominam no ingluvío e intestino delgado, enquanto *Lactobacillus acidophilus* é encontrado no ingluvío, cloaca, duodeno, jejuno e cecos, os quais apresentam desempenho favorável contra agentes com potencial patogênico (ANGELAKIS; RAOULT, 2010). Entre as vantagens dos *Lactobacillus*, podemos citar: auxílio na imunidade, ao estimular a secreção de imunoglobulina IgA intestinal (ANDREATTI-FILHO, 2007), secreção de lactato, acetato, succinato e etanol, os quais auxiliam na proliferação de outras bactérias benéficas como *Veillonella* spp., *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. (KALAVATHY et al., 2003; PELICANO et al., 2007; BARROS et al., 2009).

2.6.2.2 *Bacteroides* spp.

O gênero *Bacteroides* spp. representa bactérias Gram-negativas, anaeróbias, cocos de tamanhos variados, imóveis, sendo isoladas principalmente de ambientes anaeróbios como trato entérico, cavidade oral e lesões purulentas (GARCIA et al., 2012). Estão presentes no ceco, e são importantes no desenvolvimento, na manutenção da função normal do intestino e na atividade imune, mas também podem ser um importante agente patogênico, principalmente quando há condições predisponentes, como lesão na mucosa intestinal (KANDLER; WEISS, 1986).

2.6.2.3 *Bifidobacterium* spp.

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp. são anaeróbias estritas, imóveis, Gram-positivo, não esporuladas, em forma de bastonete curvo, caracterizados frequentemente por uma bifurcação em forma de Y. O seu “habitat” natural é o intestino delgado e grosso, sua

população sofre a influência de fatores exógenos como a dieta, estresse e antimicrobianos (DRIESSEN; BOER, 1989; GIBSON; ROBERFROID, 1995; AMIT-ROMACH; SKLAN; UNI, 2004). Digerem oligossacarídeos não digeríveis no ceco por meio de fermentação, usando-os como fonte de carbono e energia (LAROIA; MARTIN, 1990; GOMES; MALCATA, 1999). Essas bactérias estimulam/fortalecem o sistema imunológico devido à ativação da proliferação dos macrófagos; controlam infecções intestinais (RASIC; KURMANN, 1983; MISRA; KUILA, 1992; DUNCAN; EDBERG, 1995); possuem atividade anticarcinogênica e auxiliam a digestão e absorção de nutrientes por agirem nos sais biliares (WIJSMAN; HEREIJGERS; GROOTE, 1989; LEAHY et al., 2005; ANDREATTI FILHO, 2007). Além disso, auxiliam na redução do pH do meio intestinal, devido à atividade antibacteriana que produz ácido láctico e acético a partir de açúcares (BERGOGNE-BEREZIN, 1989; MISRA; KUILA, 1992; O'SULLIVAN et al., 1992; VIJAYENDRA; GUPTA, 1992; ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993).

2.6.2.4 *Fusobacterium* spp.

Fusobacterium correspondem bactérias anaeróbias, Gram-negativas pertencentes à família Bacteroidaceae. Não formadoras de esporos, imóveis e cocos que podem ser ou não fusiformes, e geralmente muito pleomórficas. Bactérias desse gênero fazem parte da microbiota normal, habitando o intestino superior e posterior das aves (LIN; HUH; BAEK, 1993). Porém sua característica benéfica se dá ao competir com *Salmonella* spp. por sítios de ligação no intestino (BROWN; ROTTINGHAUSGE; WILLIAMS, 1992; APAJALAHTI; KETTUNES; GRAHAM, 2004).

2.6.2.5 *Salmonella* spp.

Pertencentes à família “Enterobacteriaceae” compreendem microrganismos patogênicos, bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, desenvolvendo-se bem à temperatura de 37°C. Não produzem esporos, altamente adaptados aos hospedeiros (SHIVAPRASAD, 2000), não fermentam lactose, sendo movidas por flagelos peritríquios (CHAMBERS; SPENCER; MODLER, 1997; CORRIER et al., 1999).

Por estar amplamente distribuída na natureza, a *Salmonella* pode infectar as aves, o homem, insetos, peixes, répteis e mamíferos em geral, causando a enfermidade denominada salmonelose. Esta por sua vez, pode ocorrer em equilíbrio na microbiota intestinal, sem

aparecimento de sinais clínicos, sem nenhum efeito maléfico, mas quando em situação de desequilíbrio pode levar a alterações intestinais e septicêmica (JEURISSEN et al., 2000; ANDREATTI-FILHO, 2007). A infecção por *Salmonella* em animais, frequentemente resulta em portadores. De acordo com Kampelmacher (1987), entre os fatores que determinam o estado de portador, estão às rações contaminadas e a existência de ciclos de contaminação nos quais a água, o solo, a poeira e o ar, bem como insetos, roedores, pássaros e o homem desempenham papéis importantes (ZHU et al., 2002; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

2.6.2.6 *Clostridium* spp.

Pertencentes à família *Bacillaceae*, microrganismos do gênero *Clostridium* são anaeróbios, encapsulados, móveis e, bioquimicamente, são classificados como gelatinase, maltose, sacarose, indol e nitrato positivos, e salicina negativos (TIMBERMONT et al., 2010). Entretanto, se o microambiente digestivo for alterado, ocorre uma proliferação dessas bactérias e então, a ocorrência de enfermidades (SKRIVANOVÁ et al., 2005; TIMBERMONT et al., 2010). As espécies de *Clostridium* de importância para as aves que levam a alterações intestinais são: *Clostridium colinum* que causa enterite ulcerativa, principalmente em aves jovens (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009; REVOLLEDO, 2009) e a *Clostridium perfringens* participa da microbiota intestinal normal de aves, porém, alguns fatores como mudanças bruscas na alimentação, stress, salmoneloses, micotoxinas e coccidiose fazem com que este microrganismo reproduza-se rapidamente produzindo toxinas que causam lesões ulcerativas e necrose da mucosa intestinal levando a uma doença conhecida como enterite necrótica (SAIF; BRAZIER, 2008).

2.6.2.7 *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* spp. constitui-se de bactérias Gram-negativas, encurvadas ou em forma de S; espiralada, não esporulada; podem apresentar forma filamentosa ou cocóide nos cultivos velhos; geralmente móveis; quimiorganotróficos; metabolismo respiratório; incapazes de utilizar açúcares (nem oxidação nem fermentação); oxidase positiva, catalase variáveis; não hidrolisam a gelatina nem a ureia (com exceção as linhagens atípicas do *C. lari* e linhagens do *C. sputorum* biovar *Paraureolyticus*); desprovidos de lipase. Apesar de extensa colonização, determinam pouca ou nenhuma doença clínica na ave, geralmente não sendo patogênicos (VANDAMME et al., 1991; ZHANG, 2008). Fatores estressantes,

imunossupressão e doenças intercorrentes, podem levar a quadro clínico da doença, assim como a sintomatologia depende da cepa e da dose infectante. Os sinais clínicos apresentados pelas aves são depressão, redução do ganho de peso, anemia, icterícia e diarreia (BALIAN, 2009).

2.6.2.8 *Escherichia coli*

Pertencem à família Enterobacteriaceae, se caracteriza como bastonete Gram-negativo, anaeróbicos facultativos, em sua maioria são móveis com flagelo peritríqueos, e não produzem esporos. Pode ser encontrada ao longo do trato gastrointestinal das aves em concentrações acima de 10^6 UFC/g de excretas, podendo esse número ser elevado em aves jovens, o qual a microbiota não está totalmente estabelecida (BUMSTEAD; HUGGINS; COOK, 1989; LEITHNER; HELLER, 1992; ONYANGO; BEDFORD; ADEOLA, 2005). As bactérias do gênero *Escherichia coli*, patogênica para aves, são responsáveis por diferentes quadros infecciosos, atuando como agente primário ou secundário.

2.7 Efeitos dos antibióticos na dieta animal

Os antibióticos correspondem a microingredientes utilizados na dieta animal, os quais variam quanto aos objetivos de seu emprego e/ou eficiência alimentar. Os mesmos são compostos sintetizados por organismos vivos (fungos, bactérias ou elementos sintéticos) que inibem o crescimento dos outros e sua utilização em níveis subterapêuticos em rações de animais tem ocorrido desde 1940. Estes controlam agentes patogênicos ao processo digestivo, promovendo melhora nos índices zootécnicos e maximizando a produção (FULLER, 1989; SANTOS; TURNES, 2005).

Portanto, a utilização prolongada de certos antibióticos pode provocar uma seleção de estirpes resistentes dentro de grupos de bactérias que são patógenas primárias ou oportunistas para humanos (KOCK, 1981; JIN; HO; ZHAO, 1997). Pesquisas têm sido intensas em vários países e cada vez mais aprofundadas quanto ao uso de antibióticos e seus problemas potenciais relacionados aos riscos à saúde pública e, mesmo sem conclusões definitivas, a opinião pública tem influenciado as autoridades a adotarem políticas de restrição desses aditivos na alimentação animal e conseqüentemente, tem estimulado determinar uma redução na lista de antibióticos de uso autorizado como promotores de crescimento (CLOSE, 2000; CHANDER et al., 2007).

Existem diferentes mecanismos podem explicar a resistência bacteriana aos antibióticos: a bactéria produz enzimas que podem destruir ou modificar a estrutura do antibiótico; os antibióticos podem ser incapazes de penetrar na superfície das células bacterianas e, dessa forma, não podem atuar no sítio suscetível dentro da célula, como os ribossomos; a bactéria pode possuir uma via bioquímica alternativa que desvia a reação particular que é inibida pelo antibiótico e, finalmente, pode possuir um aporte de enzimas, ribossomos ou outros componentes celulares que não são afetados pelo uso de determinado antibiótico (HUDSON, 1989; (DEWDNEY et al., 1991; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996; HAWRELAK; MYERS, 2004). Porém, há uma preocupação crescente quanto aos resíduos de antibióticos em produtos de origem animal, porque esses podem trazer alguns prejuízos para as pessoas que consomem esses produtos.

Dessa forma, observa-se a crescente preocupação dos consumidores com a origem e qualidade dos produtos, exigindo alimentos saudáveis e ausência de resíduos. Logo, a tendência dos produtores rurais assim como as empresas terá que adequarem ao modo de produção animal, ou seja, adotar sistemas alternativos à exploração intensiva e extensiva, produzir animais com rações sem antibióticos, anticoccidianos e quimioterápicos, além de uma série de outros requisitos e normas (ALVENSLEBEN, 1997; APPLEBY, 2003; ANDERSON et al., 2004; RODENBURG et al., 2005).

Referências

- ABREU, V.M.N.; ABREU, P.G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 2, p. 1-14, 2011.
- ABU-DIEYEH, Z.H.M. Effect of high temperature per se on growth performance of broilers. **The Journal of Poultry Science**, Japan, v. 5, p. 19-21, 2006.
- ALVENSLEBEN, R.V. **Agro-food marketing**. New York: Cabi Publishing, 1997. 492p.
- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microbiota ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, Oxford, v. 83, p. 1093-1098, 2004.
- ANDERSON, K.E.; DAVIS, G.S.; JENKINS, P.K.; CARROL, A.S. Effects of bird age, density, and molt on behavioral profiles of two commercial layer strains in cages. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 15-23, 2004.
- ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca Ltda, 2007. 328 p.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. **Plos**, United States, v. 5, p. 1073-1079, 2010.

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

APPLEBY, M.C. The European Union ban on conventional cages for laying hens: history and prospects. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, England, v. 6, p. 103-121, 2003.

ARJONA, A.A.; DENBOW, D.M.; WEAVER, W.D. Effect of heat stress early in life on mortality of broilers exposed to high environmental temperatures just prior to marketing. **Poultry Science**, Champaign, v. 67, p. 226-231, 1988.

BAÊTA, F.C.; SOUZA, C.F. **Ambiência em Edificações Rurais**. Viçosa: UFV, 1997. 234 p.

BALIAN, S.C. **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole Ltda, 2009. 510 p.

BARBARA, G.; STANGHELLINI, V.; BRANDI, G.; CREMON, C.; DI NARDO, G.; DE GIORGIO, R.; CORINALDESI, R. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. **The American Journal of Gastroenterology**, United States, v. 100, p. 2560-2568, 2005.

BARBOSA FILHO, J.A.D.; SILVA, I.J.O.; SILVA, M.A.N.; SILVA, C.J.M. Avaliação dos comportamentos de aves poedeiras utilizando sequência de imagens. **Engenharia Agrícola**, Botucatu, v. 27, p.93-99, 2007.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; CROCCI, J.A. Transference in vitro of the resistance to the antimicrobials between *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella* enteritidis isolated from chickens. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, p. 1149-1153, 2009.

BAYVEL, D.; RAHAMAN, S.A.; GAVINELLI, A. Bien-être animal: enjeux mondiaux, tendances et défis. **Revue scientifique et technique**, France, v. 24, n. 2, p. 478-482, 2005.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; FÁBIO, J.D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2009. 1.104 p.

BERTECHINI, A.G. **Fisiologia da digestão de suínos e aves**. Lavras: FAEPE-UFLA, 1998. 141 p.

BESSEI, W. Behaviour of laying hens in small group systems in the view of animal welfare. **Archiv fur Geflugelkd**, Germany, v.74, p. 6-12, 2010.

BLIKSLARGER, A.T.; ROBERTS, C. Mechanism of intestinal mucosal repair. **Journal of American Veterinary Medical Association**, United States, v. 211, p. 1437-1441, 1997.

BLOKHUIS, H.J.; HOPSTER, H.; GEVERINK, N.A.; KORTE, S.M.; VAN REENEN. Studies of stresse in farm animals. **Comparative Haematology International**, England, v. 8, p. 94-101, 1998.

BRACKE, M.B.M.; HOPSTER, H. Assessing the importance of natural behavior for animal welfare. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, Canada, v.19, p. 77-89, 2006.

BROOM, D.M. A history of animal welfare science. **Acta Biotheoretica**, Netherlands, v.59, p.121-137, 2011.

BROWN, T.P.; ROTTINGHAUSGE, G.L.; WILLIAMS, M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: Performance and pathology. **Avian Diseases**, Netherlands, v. 36, p. 450-454, 1992.

BUCHON, N.; BRODERICK, N.A.; CHAKRABARTI, S.; LEMAITRE, B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in Drosophila. **Genes and Development**, United States, v. 23, p. 2333-2344, 2009.

BUMSTEAD, N.; HUGGINS, M.B.; COOK, J.K. Genetic differences in susceptibility to a mixture of avian infectious bronchitis virus and Escherichia coli. **British Poultry Science**, England, v. 30, p. 39-48, 1989.

CAMPBELL, N.A.; REECE, J.B. **Biologia**. Porto Alegre:Artmed, 2010. 1.464 p.

CHAMBERS, J.R.; SPENCER, J.L.; MODLER, H.W. The influence of complex carbohydrates on Salmonella typhimurium colonization, pH, and density of broiler ceca. **Poultry Science**, Champaing, v. 76, p. 445-451, 1997.

CHANDER, Y.; GUPTA, S.C.; GOYAL, S.M.; KUMAR, K. Antibiotics: Has the magic gone? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, England, v. 87, p. 739-742, 2007.

CHEPETE, H. J.; XIN, H. Cooling laying hens by intermittent partial surface sprinkling. **Transactions of the ASAE**, United States, v. 43, p. 965-971, 2000.

CHWALIBOG, A.; EGGUM, B.O. Effect of temperature on performance, heat production, evaporative heat loss and body composition in chickens. **Archive Geflugelkd**, Germany, v.53, p.179-184, 1989.

CLARK, J.A. **Enviromental aspects of housing for animal production**. Northingham: Page Bros Ltd, 1981. 510 p.

CLOSE, W.H. Producing pigs without antibiotic growth promoters. **Advances in Pork Production**, United States, v. 11, p. 47-52, 2000.

CORRIER, D.E.; BYRD, J.A.; HARGIS, B.M.; HUME, M.E.; BAILEY, R.H.; STANKER, L.H. Survival of Salmonella in the crop contents of market-age broilers during feed withdrawal. **Avian Diseases**, Netherlands, v. 43, p. 453-460, 1999.

COSTA, M.J.R.P. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 375p.

CUNNINGHAM, J.G. **Textbook of veterinary physiology**. New York: WB Saunders Company, 1992. 608 p.

CUNNINGHAM, D.L.; MAULDIN, J.M. Cage housing, beak trimming, and induced molting of layers: A review of welfare and production issues. **Journal of Applied Poultry Research**, United States, v. 5, p. 63-69, 1996.

CURTIS, S.E. **Environmental management in animal agriculture**. Iowa: Iowa State University Press, 1983. 409 p.

DAWKINS, M.S. Using behaviour to assess animal welfare. **Animal Welfare**, England, v. 13, p. 3-7, 2004.

DAWSON, W.R.; WHITTOW, G.C. **Sturkie's Avian Physiology**. San Diego: Academic Press, 2000. 1.056 p.

DEWDNEY, J.M.; MAES, L.; RAYNAUD, J.P.; BLANC, F.; SCHEID, J.P.; JACKSON, T.; LENS, S.; VERSCHUEREN, C. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. **Food Chem Toxicol**, England, v. 29, p. 477-83, 1991.

DONALD, J. Environmental control options under different climatic conditions. **World Poultry Elsevier**, Netherlands, v. 14, p. 22-23, 1998.

DONKOH, A. Ambient temperature: a factor affecting performance and physiological response of broiler chickens. **International Journal of Biometeorology**, United States, v. 33, p. 259-265, 1989.

DRIESSEN, F.M.; BOER, R. Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Netherlands, v. 43, p. 367-382, 1989.

DUNCAN, H.E.; EDBERG, S.C. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. **Critical Reviews in Microbiology**, England, v. 21, p. 85-100, 1995.

ENGBERG, R.M.; 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, p. 1311-1319, 2000.

ESMAY, M.L. **Principles of animal environment**. Westport: CT Avi, 1969. 325 p.

EWING, S.A.; LAY, D.C.; VON BORELL, E. **Farm animal well-being – stress physiology, animal behavior, and environmental design**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 357 p.

FAWC - **Farm Animal Welfare Committee**. London: Nobel House, 2011. 49 p.

FERREIRA, F.A.B.; KUSSAKAWA, K.C.K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. **Biociencia**, Argentina, v. 8, p. 40-43, 1999.

FERREIRA, R.A. **Maior produção com melhor ambiente para aves, suínos e bovinos.** Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 371 p.

FINDLAY, J.D.; EAKLEY, W.B. **Progress in the physiology of farm animals.** Butterworths: Scientific Publications, 1954. 392 p.

FRASER, D. Understanding animal welfare. **Acta Veterinaria Scandinavica.** Denmark, v. 50, p. 1-8, 2008.

FREEMAN, B.M. The domestic fowl in biomedical research: physiological effects of the environment. **World's Poultry Science Journal**, England, v. 44, p. 41-60, 1988.

FRIEND, T.H. Teaching animal welfare in the land grant universities. **Journal of Animal Science**, England, v. 68, p. 3462-3467, 1990.

FUJIMURA, K.E.; DEMOOR, T.; RAUCH, M.; FARUQI, A.A.; JANG, S.; JOHNSON, C.C.; BOUSHEY, H.A.; ZORATT, E.; OWNBY, D.; LUKACS, N.W.; LYNCH, S.V. House dust exposure mediates gut microbiome *Lactobacillus* enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, England, v. 111, p. 805-810, 2014.

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

FUQUAY, J.W. Heat stress as it affects animal production. **Journal of Animal Science**, England, v. 52, p. 164-174, 1981.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar o efeito de uso de probióticos, prebióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 2004, Santa Catarina. **Anais...** Santa Catarina: ACAV, 2004. p. 87-91.

FURLAN, R.L.; MACARI, M. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.** Jaboticabal: FUNEP, 2008. 375 p.

FURTADO, D.A.; AZEVEDO, P.V.; TINÔCO, I.F.F. Análise do conforto térmico em galpões avícolas com diferentes sistemas de acondicionamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, p. 559-564, 2003.

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

GARCIA, G.D.; CARVALHO, M.A.R.; DINIZ, C.G.; MARQUES, J.L.; NICOLI, J.R.; FARIAS, L.M. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group strains recovered from broiler faeces. **British Poultry Science**, England, v. 53, p. 71-76, 2012.

GEDEK, B.R. Intestinal flora and bioregulation. **Review Scientific et Technique**, France, v. 8, p. 417-434, 1989.

GERRITSEN, J.; SMIDT, H.; RIJKERS, G.T.; VOS, W.M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**, United States, v. 6, p. 209-40, 2011.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Critical Review - Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **American Institute of Nutrition**, England, v. 1 p. 1401-1412, 1995.

GIELDA, L.M.; DIRITA, V.J. Zinc competition among the intestinal microbiota. **MBio**, United States, v. 3, p. 71-82, 2012.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, England, v. 10, p. 139-157, 1999.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R.J.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; YANG, C.; HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **Microbiology Ecology**, United States, v. 59, p. 147-157, 2007.

GRIER, J.W. **Biology of animal behavior**. St. Louis: Times Mirror/Mosby College Publishing, 1984. 693 p.

HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Alternative Medicine Review**, United States, v. 9, p. 180-197, 2004.

HELESKI, C.R.; MERTIG, A.G.; ZANELLA, A.J. Assessing attitudes toward farm animal welfare: a national survey of animal science faculty members. **Journal of Animal Science**, England, v. 82, p. 2806-2814, 2004.

HRDINA, J.; BANNING, A.; KIPP, A.; LOH, G.; BLAUT, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R. The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, United States, v. 20, p. 638-648, 2009.

HUDSON, B. K. **Microbiology in Today's World**. Kendall: Hunt Publishing Company, 1989. 143p.

HUME, M.E.; KUBENA, L.F.; EDRINGTON, T.S.; DONSKEY, C.J. MOORE, R.W.; RICKE, S.C.; NISBET, D.J. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 1100-1107, 2003.

HUSEBYE, E.; HELLSTROM, P.M.; SUNDLER, F.; CHEN, J.; MIDTVEDT, T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. **American Journal of Physiology**, United States, v. 280, p. 368-380, 2001.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. *Bifidobacterium*: Research and development in Japan. **Food Technology**, England, v. 1, p. 126-135, 1993.

- JERNIGAN, M.A.; MILES, R.D. Probiotics in poultry nutrition. A review. **World's Poultry Science Journal**, England, v. 41, p. 99-107, 1985.
- JEURISSEN, S.H.M.; BOONSTRA-BLOM, A.G.; AL-GARIB, S.O.; HARTOG, L.; KOCH, G. Defense mechanisms against viral infection in poultry: A review. **Veterinary Quarterly**, United States, v. 22, p. 204-208, 2000.
- 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**, England, v. 3, p. 1-14, 2002.
- JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ZHAO, X. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, England, v. 53, p. 351-368, 1997.
- KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y.W. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, England, v. 44, p. 139-144, 2003.
- KAMPELMACHER, E.H. Poultry disease and public health. **British Poultry Science**, England, v. 28, p. 3-13, 1987.
- KANDEL, E.R. **Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology**. San Francisco: W.H. Freeman, 1976. 727 p.
- KAU, A.L.; AHERN, P.P.; GRIFFIN, N.W.; GOODMAN, A.L.; GORDON, J.I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, United States, v. 474, p. 327-336, 2011.
- KANDLER, O.; WEISS, N. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 787 p.
- KAZAKOVA, N.; LI, H.; MORA, A.; JESSEN, K.R.; MIRSKY, R.; RICHARDSON, W.D.; SMITH, H.K. A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes. **Developmental Biology**, United States, v. 297, p. 1-13, 2006.
- KIOUKIA-FOUGIA, N.; ANTONIOU, K.; BEKRIS, S.; LIAPI, C.; CHRISTOFIDIS, I.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Champaign, v. 26, p. 823-30, 2002.
- LAROIA, S.; MARTIN, H. *Bifidobacterium* as possible dietary adjuncts in cultured dairy products - a review. **Cultured Dairy Products Journal**, United States, v. 25, p. 18-22, 1990.
- LANCINI, J.B. **Fisiologia da digestão e absorção das aves**. Campinas: APINCO, 1994. 154 p.
- LAPARRA, J.M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, Champaign, v. 61, p. 219-225, 2010.

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; SIDEREN, D. Getting better with *bifidobacteria*. **Journal of Applied Microbiology**, United States, v. 98, p. 1303-1315, 2005.

LE DIVIDICH, J.; NOBLET, J.; HERPIN, P.; VAN MILGEN, J.; QUINIOU, N. **Thermoregulation**. Nottingham: University Press, 1998. 213 p.

LEE, Y.J.; KANG, M.S.; WOO, Y.K.; MO, I.P.; TAK, R.B. Competitive exclusion against *Salmonella gallinarum* of *Salmonella enteritidis* infected chickens. **Journal of Veterinary Science**, United States, v. 2, p. 33-36, 2002.

LIN, K.S.; HUH, C.S.; BAEK, Y.J. Antimicrobial susceptibility of Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 76, p. 2168-2174, 1993.

LIN, H.; MALHEIROS, R.D.; MORAES, V.M.B.; CAREGHI, C.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acclimation of broiler chickens to chronic high environmental temperature. **Archive Geflugelkd**, Germany, v. 68, p. 39-46, 2004.

LIN, H.; ZHANG, H.F.; JIAO, H.C.; ZHAO, T.; SUI, S.J.; GU, X.H.; ZHANG, Z.Y.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. I. One Week of Age. **Poultry Science**, Champaing, v. 84, p.1166-1172, 2005.

LIN, H.; JIAO, H.C.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Strategies for preventing heat stress in poultry. **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v. 62, p. 71-86, 2006.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DAHLKE, F.; BOLELI, I.C.; FURLAN, R.L.; MACARI, M. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, United States, v. 12, p. 483-492, 2003.

MAHBOUB, H.D.H.; MÜLLER, J.; BORELL, E. Outdoor use, tonic immobility, heterophil/lymphocyte ratio and feather condition in free-range laying hens of different genotype. **British Poultry Science**, England, v.45, p. 38-744, 2004.

MARCH, B.E. The host and its microflora: An ecological unit. **Journal of Animal Science**, England, v. 49, p.857-867, 1979.

MAYR, E. Behavior programs and evolutionary strategies. **American Scientist**, United States, v. 62, p.650-659, 1974.

MEAD, G.C. Prospects for competitive exclusion treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. **The Veterinary Journal**, United States, v. 159, p. 111-123, 2000.

MELTZER, A. Thermoneutral zone and resting metabolic rate of broilers. **British Poultry Science**, England, v. 24, p. 471-476, 1983.

MIAO, Z.H.; GLATZ, P.C.; RU, Y.J. Free-range poultry production - A review. **AsianAust. Journal of Animal Science**, England, v. 18, p. 113-132, 2005.

MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: ALTECH BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 1993, Flórida. **Proceedings...** Flórida: Alltech, 1993. p.133-150.

MISRA, A.K.; KUILA, R.K. Use of Bifidobacterium in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity. **Lait**, France, v. 72, p. 213-220, 1992.

MÜLLER, P.B. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. Porto Alegre: Livraria Editora Sulina, 1989. 158 p.

NOLAN, W.F.; WEATHERS, W.W.; STURKIE, P.D. Thermally induced peripheral blood flow changes in chickens. **Journal of Applied Physiology**, United States, v. 44, n. 81, p. 81-84, 1978.

OGUNTUNJI, A.O.; ADEREMI, F.A.; LAWAL, T.E.; ALABI, O.M. The influence of seasonal variation on performance of a commercial laying strain in a derived savanna environment in Nigeria. **Nigerian Journal of Animal Science**, England, v. 5, p.75-82, 2008.

ONYANGO, E.M.; BEDFORD, M.R.; ADEOLA, O. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks. **Poultry Science**, Champaing, v. 84, p. 248-255, 2005.

O'SULLIVAN, M.G.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends in Food Science & Technology**, England, v. 3, p. 309-313, 1992.

PARANHOS DA COSTA, M.J.R. Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBET, 2000. p. 26-42.

PELCZAR, J.R.; CHAN, J.M.; KRIEG, E.C.S. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; FIGUEIREDO, D.F.; AMARAL C. M.C. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, p. 173-180, 2007.

PROSSER, C.L.; BISHOP, D.; BROWN, F.; JAHN, T.; WULFF, V.J. Comparative Animal Physiology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, England, v. 51, p. 341-381, 1952.

QU, A.; BRULC, J.M.; WILSON, M.K.; LAW, B.F.; THEORET, J.R.; JOENS, L.A.; KONKEL, M.E.; ANGLY, F.; DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.A.; NELSON, K.E.; WHITE, B.A. Comparative metagenomics reveals host-specific metavirolomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. **PLoS**, Engnad, v. 3, p. 2945-2952, 2008.

RASIC, J.L; KURMANN, J.A.; Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. **Experientia**, Basel, v. 39, p. 1-8, 1983.

REVOLLEDO, L. **Patologia aviária**. São Paulo: Ed. Manole Ltda. 2009, 510 p.

ROCHA, J.S.R.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C. Produção e bem-estar animal: aspectos éticos e técnicos da produção intensiva de aves. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Pernambuco, v. 11, p. 49-55, 2008.

RODENBURG, T.B.; BUITENHUIS, A.J.; ASK, B.; UITDEHAAG, K.; KOENE, P.; van der POEL, J.J.; BOVENHUIS, H. Heritability of feather pecking and open-field response in laying hens at two different ages. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 862-867, 2003.

RODENBURG, T.B.; TUYTTENS, F.A.M.; SONCK, B.; DE REU, K.; HERMAN, L.; ZOONS, J. Welfare, health, and hygiene of laying hens housed in furnished cages and in alternative housing systems. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, England, v. 8, p. 211-226, 2005.

ROJAS, H.; STUARDO, L.; BENEVIDES, D. Políticas y prácticas de bienestar animal en los países de América: estudio preliminar. **Scientific and Tecnical Review**, Paris, v. 24, n. 2, p. 549-565, 2005.

ROLL, V.F.B.; BRIZ, R.C.; LEVRINO, G.A.M.; XAVIER, E.G. Effects of claw shortening devices in laying hens housed in furnished cages. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 896-901, 2008.

_____. Floor versus cage rearing: effects on production, egg quality and physical condition of laying hens housed in furnished cages. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1527-1532, 2009.

SAENGERKDSUB, S.; ANDERSON, R.C.; WILKINSON, H.H.; KIM, W.K.; NISBET, D. J.; RICKE, S.C. Identification and quantification of methanogenic archaea in adult chicken ceca. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 73, p. 353-356, 2007.

SAIF, N.; BRAZIER, J.S. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. **Journal of Medical Microbiology**, England, v. 45, p. 133-137, 2008.

SALANITRO, J.P.; BLAKE, I.G.; MUIRHEAD, P.A.; MAGLIO, M.; GOODMAN, J.R. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 35, p. 782-790, 1978.

SANTOS, J.R.G.; TURNES, C.G. Probióticos em avicultura. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 741-747, 2005.

SANTOS, M.J.B.; PANDORFI, H.; ALMEIDA, G.L.P.; MORRIL, W.B.; PEDROSA, E.M.R. GUISELINI, C. Comportamento bioclimático de frangos de corte caipira em piquetes enriquecidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 5, p. 554-560, 2010.

SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, United States, v. 31, p. 107-133, 1977.

SCOTT, G. **Essential Animal Behavior**. Champaign: Blackwell Publishing, 2005. 202p.

SELL, J.L. Physiological limitations and potential for improvement in gastrointestinal tract function of poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, United States, v. 5, p. 96-101, 1996.

SHETTLEWORTH, S.J. Animal cognition and animal behaviour. **Animal Behaviour**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 277-286, 2001.

SHIVAPRASAD, H.I. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue scientifique et technique**, France, v. 2, p. 405-424, 2000.

STEPHENSON, D.P.; MOORE, R.J.; ALLISON, G.E. *Lactobacillus* strain ecology and persistence within broiler chickens fed different diets: identification of persistent strains. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 76, p. 6494-6503, 2010.

SILVA, E.N.; ALVES FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000.p. 86-91.

SILVA, M.A.N.; FILHO, P.H.; ROSÁRIO, M.F.; COELHO, A.A.D.; SAVINO, J.M.S.; GARCIA, A.A.F.; SILVA, I.J.O.; MENTEN, J.F.M. Influência do sistema de criação sobre o desempenho, a condição fisiológica e o comportamento de linhagens de frangos para corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 208-213, 2003.

SIMON, G.L.; GORBACH, S.L. Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, United States, v. 86, p.174-193, 1984.

SHINDER, D.; RUSAL, M.; TANNY, J.; DRUYAN, S.; YAHAV, S. Thermoregulatory responses of chicks (*Gallus Domesticus*) to low ambient temperatures at an early age. **Poultry Science**, Champaign, Champaign, v. 86, p. 2.200-2.209, 2007.

SKRIVANOVÁ, E.; MAROUNEK, M.; DLOUHÁ, G.; KANKA, J. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2C18 fatty acids. **Letters in Applied Microbiology**, England, v. 41, p. 77-81, 2005.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, England, v. 11, p. 227-238, 2013.

TACTACAN, G.B.; GUENTER, W.; LEWIS, N.J.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C.; HOUSE, J.D. Performance and welfare of laying hens in conventional and enriched cages. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 698-707, 2009.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, Champaign, v. 8, p. 527-533, 1998.

TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; DEWULF, J.; NOLLET, N.; SCHWARZER, K.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. **Avian Pathology**, United States, v. 39, p.117-121, 2010.

TINÔCO, I.F.F. Avicultura industrial: Novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, p. 1-30, 2001.

TURNPENNY, J.R.; WATHES, C.M.; CLARK, J.A.; MCARTHUR, A.J. Thermal balance of livestock. 2. Applications of a parsimonious model. **Agricultural and Forest Meteorology**, Netherlands, v. 101, p. 29-52, 2000.

VANDAMME, P.; FALSEN, E.; ROSSAU, R.; HOSTE, B.; SEGERR, P.; TYTGAT, R.; LEY, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella taxonomy*: emendation of generic descriptions and proposal of *arcobacter* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, England, v. 41, p. 88-103, 1991.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, England, v. 40, p. 543-567, 1990.

VAN KAMPEN, M. Some aspects of thermoregulation in the White Legorn fowl. **International Journal of Biometeorology**, United States, v. 15, p. 244-250, 1971.

VIJAYENDRA, S.V.N.; GUPTA, R.C. Therapeutic importance of bifidobacteria and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **Indian Dairyman**, Índia, v. 44, p. 595-599, 1992.

WISEK, W.J. The mode of growth promotion by antibiotics. **Journal of Animal Science**, England, v. 46 p. 1447-1469, 1978.

VITORASSO, G.; PEREIRA, D. Análise comparativa do ambiente de aviários de postura com diferentes sistemas de condicionamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, p. 788-794, 2009.

VON BORELL, E.; VAN DEN WEGHE, S. Development of criteria for the assessment of housing systems for cattle, pigs and laying hens relating to animal welfare and environmental impact. **Zuchtungskunde**, Germany, v. 71, n. 1, p. 8-16, 1999.

WHITEHEAD, E.E. Overview of bone biology in the egg-laying hen. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 193-199, 2004.

WIJSMAN, M.R.; HEREIJGERS, J.L.P.M.; GROOTE, J.M.F.H. Selective enumeration of *Bifidobacterium* in fermented dairy products. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Netherlands, v. 43, p. 395-405, 1989.

WILLMER, P.; STONE G.; JOHNSTON I. Environmental physiology of animals. **Blackwell Science**, England, v. 2, p. 178-211, 2000.

YAHAV, S.; GOLDFELD, S.; PLAVNIK, I.; HURWITZ, S. Physiological responses of chickens and turkeys to relative humidity during exposure to high ambient temperature. **Journal of Thermal Biology**, England, v. 20, p. 245-253, 1995.

YAHAV, S.; LUGER, D.; CAHANER, A.; DOTAN, M.; RUSAL, M.; HURWITZ, S. Thermoregulation in naked neck chickens subjected to different ambient temperatures. **British Poultry Science**, England, v. 39, p. 133-138, 1998.

YAHAV, S.; STRASCHNOW, A.; LUGER, D.; SHINDER, D.; TANNY, J.; COHEN, S. Ventilation, sensible heat loss, broiler energy, and water balance under harsh environmental conditions. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 253-258, 2004.

YANAGI, T.; AMARAL, A.G.; TEIXEIRA, V.H.; LIMA, R.R. Caracterização espacial do ambiente termoacústico e de iluminância em galpão comercial para criação de frangos de corte. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 31, p. 1-12, 2011.

YEOMAN, C.J.; CHIA, N.; JERALDO, P.; SIPOS, M.; GOLDENFELD, N.D.; WHITE, B. A. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 13, p. 89-99, 2012.

ZHANG, Q. **Diseases of poultry**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. 434 p.

ZHOU, W.T.; YAMAMOTO, S. Effects of environmental temperature and heat production due to food intake on abdominal temperature, shank skin temperature and respiration rate of broilers. **British Poultry Science**, England, v. 38, p. 107-114, 1997.

ZHU, S.Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y.; JOERGER, R.D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 68, p. 124-137, 2002.

3 AMBIÊNCIA DE AVES POEDEIRAS MANTIDAS NO SISTEMA FREE-RANGE LIVRE DE ANTIBIÓTICOS: UMA ABORDAGEM DO BEM-ESTAR

Resumo

A ambiência refere-se às relações entre o animal e o ambiente que o cerca. Neste estudo, foi abordado a influência dos fatores ambientais nas características qualitativas da cama aviária e ninhos, assim como na qualidade do ar e parâmetros fisiológicos. O estudo foi conduzido em um galpão comercial de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos. O período experimental correspondeu ao período entre a 18ª e 24ª semanas de idade. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Foram avaliados o microclima da instalação, propriedades físicas da cama aviária e ninhos, pododermatite e condições de empenamento. Observou-se que as condições climáticas foram favoráveis, ou seja, as aves permaneceram dentro da zona de termoneutralidade e na faixa de conforto térmico ideal. Resultados referentes à amônia volatilizada foram satisfatórios registrando 5.49 ppm. Em relação à umidade da cama e ninhos confirmaram-se valores entre 23,23% e 18,51%, respectivamente. Não houve incidência de pododermatite. As condições de empenamento das aves apresentaram escore 4, ou seja, não apresentaram nenhum dano, as penas permaneceram íntegras em ambas as regiões avaliadas. Diante do exposto, o sistema de criação em estudo mostrou resultados totalmente satisfatórios em relação às condições de bem-estar animal.

Palavras-chave: Ambiência; Bem-estar animal; Conforto térmico; Sistema free-range

Abstract

Ambience refers to the relationships between the animal and the surrounding environment. In this study, the influence of environmental factors on the qualitative characteristics of avian bed and nests, as well as on air quality and physiological parameters were discussed. The study was conducted in a commercial shed of laying hens raised in system free-range without antibiotic. The experimental period was comprised from the 18th to the 24th weeks of age. Water and feed were supplied *ad libitum*. The microclimate of the installation, physical properties from bed and nests, pododermatitis and feathering conditions were evaluated. It was observed that the climatic conditions were favorable, that is, the birds remained within the zone of thermoneutrality and in the band of ideal thermal comfort. Results relative volatilized ammonia were satisfactory, recording 5.49 ppm. In relation to bed moisture and nests, was confirmed values between 23.23% and 18.51%, respectively. There was no incidence of pododermatitis. The feathering conditions of the birds showed a score of 4, that is, they did not present any damage, and the feathers remained intact in both regions evaluated. In view of the above, the creation system under study showed totally satisfactory results in relation to animal welfare conditions.

Keywords: Ambience; Animal welfare; Free-range systems; Thermal comfort

3.1 Introdução

A avicultura brasileira corresponde a um imenso complexo econômico. Este progresso, tanto no número de aves abatidas como de ovos produzidos, possibilitou à indústria avícola um notável potencial para prover aos consumidores, uma fonte proteica saudável e a um custo inferior.

A ambiência refere-se às relações entre o animal e o ambiente que o cerca (APPLEBY; HUGHES; ELSON, 1992). Baseada no contexto ambiental em que estes animais estão presentes, analisa as características do ambiente em função da zona de conforto das diferentes espécies, sempre considerando a fisiologia de regulação da temperatura interna atuante na espécie em questão. A ambiência encontra-se associada ao bem-estar animal, uma ciência que tem agregado à sua estrutura a obrigação de investigar e estabelecer, formas de minimizar condições estressantes como densidade animal, ausência de poluição ambiental e sonora, além de propiciar conforto e possibilitar ao animal expressar seu comportamento natural (FOUAD; RAZEK; BADAWY, 2013).

Entretanto, o ambiente é o espaço constituído por um meio físico e, ao mesmo tempo, por um meio psicológico preparado para o exercício das atividades dos animais que nele vivem (BROOM, 2011). Inclui todas as influências e condições externas que afetam o animal, como os fatores físicos, químicos, biológicos, sociais e climáticos que interagem com o animal, influenciando reações no seu comportamento, definindo assim o tipo de relação animal ambiente (CURTIS, 1983).

Dentre os fatores do ambiente, os térmicos, representados por temperatura, umidade relativa, velocidade do ar e radiação afetam diretamente a ave, pois compromete sua função vital mais importante, a manutenção da homeotermia (OLANREWAJU et al., 2010). Se estas condições estão próximas das ideais, a probabilidade de se obter alta produtividade é maior. Fora da zona de conforto térmico, as aves necessitam se valer de duras compensações fisiológicas, para manter constante a temperatura corporal. Estes ajustes são feitos em detrimentos da produção destes animais, que ao invés de utilizar os nutrientes para funções como a postura e ganho de peso, os utilizam para produzir ou dissipar calor (FISHER, 1984).

Assim, quando expostas ao estresse térmico observa-se baixo consumo de ração e, em consequência redução na produção, peso e qualidade da casca dos ovos, devido à diminuição do nível de cálcio sanguíneo das aves (TANKSON, 2001; QUINTEIRO FILHO et al., 2010). Embora a temperatura e umidade do ar, variáveis mais analisadas quando se trata de conforto

ambiental para produção de aves comercial, há outros fatores que influenciam como, iluminação, concentração de gases, poeira e microrganismos (LIN; DECUYPERE; BUYSE, 2006). Importante ressaltar que os fatores ambientais externos e o microclima dentro das instalações exercem efeitos diretos e indiretos sobre a produção animal em todas as fases de produção, podendo acarretar a redução na produtividade e saúde do animal, causando sérios prejuízos econômicos (MITCHELL; KETTLEWELL, 1998). Portanto, a qualidade da cama aviária é de suma importância, pois a ave passa a maior parte de sua vida. Esta tem como propósito fornecer qualidades apropriadas para que a ave não desenvolva problemas respiratórios e locomotores, como a pododermatite, que correspondem lesões no coxim plantar resultando baixo desempenho e comprometimento do bem-estar animal (GREENE; McCracken; EVANS, 1985; MANNING; CHADD; BAINE, 2007).

Além da conhecida influência sobre o desempenho, o empenamento também parece sofrer alteração em função da temperatura e umidade do ambiente, assim como a densidade de aves/m². Estudos realizados observaram que o empenamento das aves melhora em condições de clima frio (EDENS et al., 2000), contraditoriamente, Yalçin et al. (1997) verificaram maior empenamento em aves criadas no verão. Já Cooper e Washburn (1998), concluíram que o empenamento foi reduzido quando as aves foram expostas a uma temperatura de 32°C. Todavia, as condições do ambiente em que os animais vivem exerce efeito marcante no empenamento das aves.

Diante do exposto, objetivou-se estudar a influência de fatores ambientais nas características qualitativas da cama aviária e ninhos, assim como na qualidade do ar e parâmetros fisiológicos de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local experimental e tipologia da instalação

A pesquisa foi conduzida na fazenda, onde está sediada a empresa Korin Agropecuária Ltda e o Centro de Pesquisa Mokiti Okada, em parceria com o Departamento de Engenharia de Biosistemas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. A granja de poedeiras, localizada no município de Ipeúna - São Paulo apresenta latitude sul 22°26'09'', 47°43'08'' de longitude oeste e uma altitude média de 635 metros.

Segundo a classificação de Köppen, o clima é do tipo Cfa (subtropical úmido) com temperatura média anual de 18,1°C e 1.500 mm de precipitação anual acumulada.

A execução da pesquisa procedeu-se em um galpão comercial (Figura 1) na orientação sudeste-noroeste (124° SE e 310° NW). O período experimental compreendeu-se durante os meses de julho, agosto e setembro de 2015, nas fases de pré-postura e postura (18^a a 24^a semanas de idade). Importante ressaltar que as instalações, assim como o manejo realizado diariamente na granja respeitam as normas vigentes estabelecidas pela *Humane Farm Animal Care* (HFAC), sendo um rigoroso protocolo de certificação conferido às empresas produtoras que implantam e seguem normas com relação ao bem-estar animal. Normas estas que asseguram uma alimentação equilibrada, livre de antibióticos, abrigos e área de repouso para os animais onde podem manifestar o comportamento natural de sua espécie. As características do galpão foram as seguintes:

- Dimensões do galpão: 9,85 metros de largura x 70,0 metros de comprimento e pé direito de 3,00 metros. Cobertura com telhas de fibrocimento, beiral de 0,60 m e paredes de alvenaria;

Figura 1 - Vista de frente (A), atrás (B) e interna (C) e (D) do galpão comercial de aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

- Muretas laterais de alvenaria de 60 cm de altura, telado e providos com cortinas laterais acionadas manualmente. Equipados com ventiladores e sistema de nebulização automático;
- Piso de concreto coberto com cama de maravalha (8 cm de altura) e ninhos distribuídos ao longo da extensão do galpão na proporção de 1:6 aves poedeiras e poleiros;
- Comedouros tipo calha automático e bebedouros pendulares. A distribuição dos comedouros, bebedouros e a área do poleiro foram ajustados pelo número de aves alojadas;
- Ao redor do galpão possui uma área de piquete (pastagem) e árvores, cercadas com tela de alambrado.

3.2.2 Animais utilizados na pesquisa e período experimental

Ressalva-se que a proposta da referente pesquisa foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovada de acordo com o protocolo nº 2015- 09. As pintainhas com um dia de idade foram provenientes do incubatório Hygen Genética Avícola Ltda, município de Rio Claro/SP. Estas permaneceram durante a fase de cria e parte da recria em outro galpão na empresa Korin Agropecuária Ltda, em piso de concreto, coberto com cama de maravalha, alimentadas com rações formuladas à base de produtos exclusivamente de origem vegetal, sem adição de antibióticos e quimioterápicos.

A prática de debicagem foi efetuada de forma diferenciada do sistema convencional, ou seja, no período compreendido entre 90 dias de idade, as aves foram submetidas a um desgaste da ponta afiada dos bicos, sendo realizada uma apara leve no bico da ave para evitar que este cresça exageradamente e dificulte o consumo do alimento. Esta apara é diferente da debicagem realizada no sistema convencional, pois não realiza o corte severo e consiste uma única vez, de acordo com as normas da HFAC.

Na 13^a semana de idade as aves foram transferidas para o galpão comercial da própria empresa. Portanto, foram alojadas 5.098 aves poedeiras da linhagem Lohmann Brown na densidade de 7,28 aves/m².

3.2.3 Manejo das aves

Durante todo o período experimental, água e ração foram fornecidas *ad libitum*, ressaltando que a ração formulada consistia sem adição de antibióticos e quimioterápicos. De acordo com as práticas de manejo estabelecidas pela empresa, as coletas dos ovos foram

realizadas duas vezes ao dia da 15^a a 22^a semanas de idade das aves, e posteriormente as coletas passaram a ser efetuadas três vezes ao dia. Os animais permaneciam soltos no galpão e tinham acesso livre à área ao piquete (Figura 2).

Figura 2 - Galinhas poedeiras na área externa e interna do galpão

3.3 Etapas da pesquisa

3.3.1. Avaliação do microclima na instalação

As variáveis meteorológicas, temperatura (Tar, °C), umidade relativa do ar (UR, %) e temperatura do ponto de orvalho foram registradas diariamente durante todo o período experimental, ao longo das 24 horas em intervalos de uma hora. Para o registro dessas variáveis foi utilizado termo higrômetros com registro automático de dados da marca HOBO®, tipo “data logger”, modelo H08-00X-02. Os “data logger” foram instalados a 1,5 metros de altura da cama, em três pontos distintos no interior do galpão (início, meio e fim) e outro na área externa do galpão. Estes foram acondicionados em mini estações meteorológicas, a fim de evitar quaisquer interferências animal ou por intempéries. Semanalmente os equipamentos eram retirados e armazenados as medidas registradas, em seguida programadas para uma nova coleta de dados, sempre verificando o funcionamento do equipamento.

Dentre os índices de avaliação de conforto térmico existentes, a entalpia tem sido proposta como o índice mais adequado para a avaliação do ambiente (MOURA et al., 1997). Isso porque é um índice que depende diretamente da temperatura e da umidade relativa do ar e expressa a quantidade de energia presente no ambiente. Sendo assim, de maneira geral, quanto maior o valor da entalpia, maior a quantidade de energia (calor) existente no ar seco (ambiente) (FURLAN, 2002).

A zona de conforto atribuída às aves poedeiras está relacionada às combinações de umidade e temperatura do ar ambiente. Essas duas variáveis são responsáveis pela capacidade das aves dissiparem calor (TEETER, 1996). Portanto, a Equação (1) para o cálculo de entalpia foi descrita por Villa Nova (1999) e utilizada por Barbosa Filho (2005).

$$H = 6,7 + 0,243 * Tar + \left\{ \frac{UR}{100} * 10^{\frac{7,5*Tar}{237,3+Tar}} \right\} \quad (1)$$

Em que:

H = entalpia específica (kcal/kg ar seco)

Tar = temperatura do ar (°C)

UR = umidade relativa do ar (%)

Em seguida, a avaliação do conforto térmico do ambiente foi baseada no Índice de Entalpia de Conforto (IEC), dado pela utilização das Tabelas de Entalpia (Apêndice A) de acordo com Barbosa Filho et al. (2007). O uso desta variável psicrométrica auxilia responder a maior parte das perguntas relacionadas ao estresse térmico e as perdas que pode ocasionar.

Ainda utilizando os dados da temperatura do ar (Tar) e temperatura do ponto de orvalho foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU) pela Equação (2) proposta por Thom (1958).

$$ITU = Tar + 0,36 * Tpo + 0,42 \quad (2)$$

Em que:

ITU = índice de temperatura de globo negro

Tar = temperatura do ar (°C)

Tpo = temperatura de ponto de orvalho

3.3.2 Avaliação das propriedades física da cama e ninhos

3.3.2.1 Determinação da umidade da cama e ninhos

Para obtenção percentual de umidade da cama, foram realizadas duas coletas de cama ao longo do período experimental. As amostras de cama foram coletadas em três pontos distintos do galpão (início, meio e fim), sendo que cada coleta foi composta de 20 amostras de cama em pontos representativos.

Vale ressaltar que foram evitadas as áreas próximas e abaixo dos comedouros e dos bebedouros, conforme metodologia utilizada por Singh et al. (2004). Cada ponto de coleta amostral da cama correspondeu a um círculo de aproximadamente 20 cm de raio e 7 cm de altura, sendo as amostras retiradas com a ajuda de trado e pá. Em seguida as 20 amostras de cama coletadas foram separadas em 4 porções, na sequência realizou-se um “pool” dessas porções perfazendo-se 5 amostras compostas, que foram descompactadas, homogeneizadas e acondicionadas em bandejas de alumínio descartáveis. O mesmo procedimento foi realizado para análise da cama dos ninhos.

Na sequência as amostras foram submetidas ao processo de pré-secagem, em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas, realizando-se após, a secagem definitiva em estufa a 105°C por 24 horas. Após o período de secagem, foi realizada a pesagem final das amostras e os resultados calculados conforme as equações abaixo, ou seja, conteúdo de água em base úmida (Equação 3) e o conteúdo de água em base seca (Equação 4):

$$\% \text{ Umidade} = (A-B) \times 100 / C \quad (3)$$

$$\% \text{ MS} = 100 - \% \text{ umidade} \quad (4)$$

Em que:

A= peso do cadinho + peso da amostra

B= peso do cadinho + peso da amostra após secagem (g)

C= peso da amostra (g)

3.3.2.2 Determinação do pH da cama e ninhos

Para determinação do pH da cama e ninhos foi utilizada a metodologia descrita por Camargo e Valadares (1980), na qual foram utilizadas amostras de 20g de cama dissolvidas em água destilada em uma proporção de 1:4 (amostra de cama: água). A mistura permaneceu em repouso por uma hora e, logo após, foi realizada a leitura do pH com um medidor elétrico de pH (pHmetro).

3.3.2.3 Determinação da amônia liberada pela cama

Em frascos de 500 mL, foram colocados 70 g de cama coletada juntamente com um béquer contendo 10 mL ácido bórico 2% (m/v) (de 50 mL), sendo a seguir tampado. O frasco incubador foi mantido em incubação por 24 horas, a uma temperatura constante de 30°C. A solução fixadora de amônia foi titulada com ácido sulfúrico 0,05N (HERNANDES et al., 2002). Os resultados foram expressos em miligramas de amônia liberada, calculados pela Equação 5:

$$A = (V_t \times N \times 17) \quad (5)$$

Em que:

A = mg NH₃;

V_t = o volume da solução de HCl gasto na titulação (mL);

N = a normalidade do ácido usado (0,0543N).

3.3.3 Avaliação de pododermatite

A avaliação de pododermatite foi realizada mensalmente por meio da observação da integridade do coxim plantar. A metodologia aplicada foi baseada no Welfare Quality (2009). As aves foram selecionadas aleatoriamente, em seguida observadas ambas as patas de cada

ave e a pontuação da gravidade da dermatite foram constatadas pelo maior escore observado (Figura 3). Os escores variaram de 0 para nenhuma evidência de pododermatite até 4, para uma grave lesão.

Figura 3 - Escore de pododermatite para aves do protocolo Welfare Quality®
Fonte: Welfare Quality (2009)

3.3.4 Análise das condições de empenamento

As aves foram selecionadas aleatoriamente e realizada a avaliação da aparência externa dos animais durante todo o período experimental. Os danos no empenamento foram registrados para as seguintes regiões do corpo das aves: cabeça, pescoço, peito, cauda, asas e região da cloaca. Os escores empregados para as avaliações foram adaptados das observações de Barehan (1976), Taylor et al. (2001), Onbasilar e Aksoy (2005) e Tauson et al. (2006). Dessa forma foram adotadas as pontuações listadas na Tabela 1:

Tabela 1- Escores de avaliação do empenamento para cada região avaliada

Escores	Descrição
4	Nenhum dano, penas íntegras;
3	Penas ligeiramente quebradas;
2	Penas muito quebradas, sem expor a pele;
1	Região sem penas e com lesão na pele.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Parâmetros climáticos

Nas Figuras 4 e 5 representam as variações das temperaturas e umidade relativa no ambiente interno e externo do galpão. Constatou-se que as temperaturas durante todo o período experimental permaneceram entre 14,89 °C a 25,89°C na área interna do galpão, e 14,63°C a 27,10°C na área externa. Interessante mencionar que tais valores foram inferiores à faixa de termoneutralidade correspondente para aves poedeiras adultas, uma vez que Freeman (1988) afirma que a zona de termoneutralidade ideal para aves adultas varia entre 21°C a 28°C.

Todavia, a zona de termoneutralidade dos animais está relacionada com o ambiente térmico ideal (MODREY; NICHELMANN, 1992), onde a amplitude, ou seja, a diferença de temperaturas máximas e mínimas é estreita. Nesta faixa, os animais encontram condições perfeitas para expressar suas melhores características produtivas e comportamentais (HVIDSTEN; HAUGEN, 1977). Cabe ressaltar que, conforme a elevação da temperatura ambiental, o consumo de ração diminui consequentemente a ingestão de nutrientes essenciais de energia, ocasionando assim uma redução na produção de ovos, além de provocar estresse nas aves (PAYNE, 1967; SAMARA; ROBINS; SMITH, 1996).

Figura 4 - Variação da temperatura (°C) e umidade relativa (%) no microambiente interno do galpão durante todo o período experimental

Mowbray e Sykes (1971) trabalhando também com temperaturas constantes (30°C) e cíclicas (13 a 35°C), e com rações de diferentes densidades de energia e proteína (14,3%, 16% e 18,2%) e (2.636 kCal EM/kg, 2.979 kCal EM/kg e 3.352 kCal EM/kg), respectivamente, verificaram uma redução na produção de ovos obtida com aves alimentadas com as mesmas dietas, em ambientes de 13 a 35°C. As aves acondicionadas em temperatura constante de 30°C mostraram menor ingestão de alimento e maior perda de peso corporal, o que também foi constatado por Howes et al. (1961) e Carmon e Huston (1965). Atualmente, vários são os estudos realizados no sentido de reduzir o estresse térmico, porém há uma necessidade maior de associar-se principalmente o ambiente (instalações), o potencial genético das aves e a eficiência energética da dieta.

Com relação à umidade relativa do ar ideal para aves de postura, não há valores concretos como no caso da temperatura. Segundo Tinôco (2001) o ambiente é tido como confortável para aves adultas quando apresenta valores entre de 50 a 75%. Pode-se afirmar que valores elevados de umidade relativa, as aves ficam mais sensíveis ao estresse calórico. Outro problema sério causado pela alta umidade relativa nos aviários que utilizam cama, ao invés de gaiolas, é seu umedecimento, o que além de trazer problemas de saúde às aves, ainda poderão comprometer a qualidade dos ovos (MIJS, 1999). Nesse estudo, o valor médio de umidade relativa obtida na área interna correspondeu 73,05 %, e 62,01% na área externa do galpão. Entretanto, os valores supracitados em ambas as áreas mantiveram-se dentro do esperado para aves de postura na fase de produção.

Mesmo na área externa, onde as aves ficavam expostas a radiação solar não apresentou umidade relativa maior que 75%, fato relacionado à grande área de pastejo e sombra das árvores, além da relativa efetividade da ventilação natural. Portanto, os valores médios de umidade relativa do ar mensurados neste trabalho permaneceram dentro dos limites sugeridos por Tinoco (2001).

Figura 5 - Variação da temperatura (°C) e umidade relativa (%) no microambiente externo do galpão durante todo o período experimental

Importante ressaltar que a umidade relativa do ar exerce grande influência no bem-estar e na produtividade do animal, principalmente quando é baixa, causando diversas doenças no aparelho respiratório, ou elevada associada a altas temperaturas do ar, dificultando a dissipação de calor corporal por processos evaporativos (BAÊTA; SOUZA, 2010). A capacidade das aves em suportar o calor é inversamente proporcional ao teor de umidade do ar sendo que, quanto maior a umidade relativa do ar maior também a dificuldade dos animais em remover calor interno pelas vias aéreas, o que leva ao aumento da frequência respiratória. Durante este processo que a ave realiza com o intuito de manutenção da homeotermia ocorrem modificações fisiológicas que podem comprometer seu desempenho afetando sobremaneira a produção e a qualidade dos ovos (FRANCO JIMENEZ et al., 2007).

Dada a importância da umidade relativa e sua relação com a temperatura do ar seco para o conforto térmico ambiental, foi realizada a análise do Índice de Entalpia. Assim, por meio dos valores médios de temperatura e umidade relativa do ar obtido durante o período experimental, foi calculada a entalpia. Ressalta-se que a entalpia é uma variável física que indica a quantidade de energia contida em uma mistura de gás (ESMAY, 1979). Portanto, nos casos de mudança de umidade relativa, para uma mesma temperatura, a energia envolvida nesse processo se altera, e, conseqüentemente, a troca térmica que ocorre no ambiente também sofre alterações (NÄÄS et al., 1997). A zona de conforto térmico é a faixa de temperatura do ambiente na qual a taxa metabólica é mínima, e a temperatura do corpo do animal é mantida com muito pouco desprendimento de energia (FURLAN, 2006).

Verificou-se que os valores médios da entalpia (Figura 6) apresentaram diferenças entre as áreas avaliadas, isto é, a entalpia na área interna correspondeu entre 53,4 a 67 KJ/Kg

ar seco, enquanto que na área externa compreendeu-se entre 53,7 a 64,4 KJ/Kg ar seco. Porém, os mesmos indicaram que as aves permaneceram na faixa de conforto térmico ideal (verde) conforme a tabela de entalpia (Apêndice A).

Figura 6 - Valores de entalpia real na área interna (AI) e externa (AE) do galpão para a condição de conforto (Entalpia real) e a faixa considerada ideal para avepoedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos com respectivos limites, inferior e superior de conforto

Em relação aos valores médios de ITU analisados nos intervalos de horas (Figura 7), verificou-se que o ambiente não causou nenhum desconforto aos animais, mesmo nos intervalos que poderiam ser considerados críticos (10h00min às 15h00min). Nota-se que os valores de ITU desta pesquisa foram entre 60,19 a 72,54, valores inferiores em comparação do recomendado por Armstrog (1994), Gates (1995) e Barbosa Filho (2004), em que o ambiente considerado confortável para aves de postura e para frango de corte é aquele no qual o ITU varia entre 71 e 75, acima de 75 a 79 representam situações de alerta e perigo para a produção, e entre 79 e 84 indicam situações de emergência, sendo necessário providências urgentes para se evitar a perda do plantel.

Figura 7 - Valores de ITU na área interna (AI) e externa (AE) do galpão e a faixa considerada ideal para aves, com os respectivos limites, inferior e superior de conforto do índice

De acordo com Yahav et al. (2004) e Welker et al. (2008), o conforto térmico no interior de instalações avícolas é importante, pois condições climáticas inadequadas afetam negativamente o desempenho do animal, tornando indispensável o estudo das características ambientais das instalações de cada região, principalmente em regiões com climas tropical e subtropical. Todavia, as avaliações ambientais permite a determinação do reflexo do desconforto dos animais (CLARK, 1981) em decorrência de situações completamente adversas à zona de conforto térmico. Uma vez que os índices de conforto térmico (H e ITU) obtidos dentro e fora do galpão permaneceram na zona de conforto para as aves, pode-se considerar que foram caracterizadas situações totalmente adequadas e não estressantes para criação de aves de postura.

3.4.2 Avaliação da qualidade do ar e propriedades físicas da cama e ninhos

A concentração de amônia (NH_3) resultante da avaliação realizada durante todo o período experimental está representada na Tabela 2. Como observado, a concentração da amônia foi de 5,49 ppm, valor inferior ao preconizado na literatura, cujo limite de tolerância é de 20 ppm (MTE, 1990; GLOBALGAP, 2007; MANNING et al., 2007), e diferentemente das recomendações de Cobb-Vantress (2008) que considera a concentração ideal de 10 ppm. Já

com relação ao bem-estar animal, a HFAC (2006) e a Council Directive 2007/43/EC (2007) estabelecem que a concentração de NH_3 para a criação de aves não deve ser superior a 20 ppm. Logo, o valor encontrado nessa pesquisa não foi comprometedor, e sim favorável à criação de aves poedeiras no sistema free-range livre de antibióticos.

Sabe-se que os níveis de concentração de NH_3 podem ser influenciados por fatores como umidade, tempo de uso e manejo da cama, pH da mesma e a densidade de criação. Tais fatores, segundo Macari e Furlan (2001) aceleram a decomposição microbiana do ácido úrico dos excrementos aumentando a produção de NH_3 . A elevada concentração de amônia nos galpões provoca problemas como a redução de peso dos animais, lesões nos olhos e subdesenvolvimento da carcaça (WATHES et al., 1998; NÄÄS et al., 2007; VITORASSO; PEREIRA, 2009; FURTADO et al., 2010).

Vale também ressaltar que a umidade, temperatura e a qualidade do ar no interior do galpão avícola podem ser afetadas pela qualidade da cama (PATTERSON, 2005). Outro fator extremamente importante é a qualidade do ar na criação de aves, pois as trocas de ar inadequadas aumentam as concentrações gases no interior das instalações que diminuem a concentração de oxigênio, deixando o ambiente propício à incidência de doenças no trato respiratório, tanto nos animais quanto nos funcionários (KRISTENSEN et al., 2000; HARPER; FLESCHE; WILSON, 2010). No estudo de emissões de amônia Miragliotta (2000) encontrou maiores concentrações do gás no ar e maior índice de condenação em sistemas de produção de alta densidade. Porém, o controle da ventilação é de suma importância para manter a umidade e a amônia abaixo dos limites críticos (HELLICKSON; WALKER, 1993; MENEGALI et al., 2012).

Ressalva-se que a qualidade da cama é responsável pelo acréscimo de produção de gases dentro do galpão, de maneira que, tanto a concentração como o potencial de emissão, está vinculada a itens como umidade e pH, que por sua vez são produtos do ambiente interno (SAINSBURY, 1981). Com relação à umidade da cama e dos ninhos (Tabela 2) constatou-se que os valores estavam abaixo de 35 %, valor esse considerado dentro dos parâmetros ideais (COBB-VANTRESS, 2008). Para Baião (1996) o teor de umidade da cama pode variar entre 40% e 60% para a criação de frangos de corte. Para Paganini (2004) a umidade da cama em um sistema convencional deve variar entre 18% e 40%, dependendo da densidade animal e época do ano.

Tabela 2 - Teor da umidade (%), pH e amônia volatilizada da cama e dos ninhos de aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Itens Avaliados	Características		
	Umidade (%)	pH	Amônia Volatilizada (ppm)
Cama aviária	23,23	8,15	5,49
Ninhos Inferiores	17,62	7,70	-
Ninhos Superiores	18,51	7,50	-

A umidade da cama é uma das maiores preocupações na produção avícola devido ao impacto negativo à saúde, bem-estar e desempenho produtivo das aves (NDEGWA et al., 2008). As causas de uma cama úmida em galpões com frangos de corte são sempre multifatoriais e em geral, se devem a uma interação entre nutrição, manejo e condições da saúde intestinal das aves (CURTIS, 1993).

O pH da cama também desempenha papel importante na volatilização da amônia. O acúmulo de amônia e material fecal aumenta o pH da cama, que varia tipicamente de 7 a 8,5. Logo, os teores de pH da cama e dos ninhos (Tabela 2) encontrou-se no limite desejável, conforme pesquisas realizadas por Reece (1979) e Carr (1990). A liberação de amônia é menor quando o pH da cama está abaixo de 7,0, mas é substancial quando está acima de 9,0, sendo que a decomposição do ácido úrico é mais favorecida em condições de pH alcalino (TERZICH, 1997; ELLIOT; COLLINS, 1982). A amônia, uma vez formada na cama, pode-se encontrar em duas formas: como NH_3 (sem carga) ou como íon amônio (NH_4^+), dependendo do pH da cama (BLAKE, 2000). Sabe-se que quanto maior o pH, menor será a conversão de NH_3 , que é volátil, em NH_4^+ , que não volatiliza.

3.4.3 Avaliação de pododermatite

Os resultados mostraram que não houve incidência de pododermatite nas aves, apresentando escore 0 (ausência de lesões) durante todo o período experimental (Figura 8), fato este relacionado com a excelente qualidade da cama e do ar em que as aves permaneceram alojadas. A pododermatite está atribuída às condições inadequadas da cama, particularmente o excesso de umidade (MARTLAND, 1984; GREENE et al., 1985; MCILROY et al., 1987). Outros fatores como alta densidade (MARTRENCAR et al., 1997;

MCILROY et al., 1987), fatores climáticos, ventilação (SHEPHERD; FAIRCHILD, 2010) e deficiência de biotina (HARMS et al., 1977) podem predispor à ocorrência de pododermatite.

A ocorrência de pododermatite é utilizada como critério de bem-estar em sistemas de produção de frango de corte na Europa e Estados Unidos. As audições de bem-estar animal na Europa frequentemente utilizam pés, jarretes, e queimaduras no peito como indicador de bem-estar em aves. (BERG, 2004; NATIONAL CHICKEN COUNCIL, 2010).

Importante ressaltar que aves de postura mantidas em gaiolas apresenta um alto índice de lesão no coxim plantar, garras grandes, discondroplasia tibial e outras injúrias (APPLEBY; HUGHES; ELSON, 1992). A lesão do coxim plantar é ocasionada pela alta pressão que o corpo do animal exerce diretamente no arame fino da gaiola. Lembrando que o fio grosso não é utilizado em gaiolas, pois quebra dos ovos (BESSEI, 2006).

Pearson (1983), Hughes e Appleby (1989), Tauson (1988) e Tauson e Jansson (1990) estudaram alternativas de piso de arame em gaiolas, ou seja, melhoram o design das mesmas, assim como a declividade do piso, porém concluíram que não solucionava o problema de lesões nos coxins. Outro problema agravante de galinhas criadas em gaiolas é a restrição dos movimentos resultando em fraqueza óssea, pois a tíbia de ave criadas em piso apresentam 41% mais fortes em comparação com aves mantidas em gaiolas (MCLEAN et al., 1986; ASHTON, 1988).

Figura 8 - Coxim plantar de aves poedeiras com 18 semanas de idade (A), (B), (C); e com 24 semanas de idade (D), (E) e (F) criadas no sistema free-range livre de antibióticos

3.4.4 Condições de empenamento

O empenamento das aves envolve mecanismos fisiológicos complexos, influenciados por fatores ambientais, densidade, nutricionais, hormonais e genéticos, bem como pela interação entre eles (KRUEGER, 1994). Desta forma, verificou-se neste estudo que as

condições de empenamento dos animais apresentaram escore 4, ou seja, nenhum dano, penas íntegras em ambas as regiões avaliadas (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Registro de imagem da região da cabeça (A); pescoço (B); peito (C); cauda e cloaca (D) e asas (E), (F) de aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos na 18ª semana de idade

Figura 10 - Registro de imagem da região da cabeça (A); pescoço e peito (B); asas (C), (D); dorso (E) e cauda e cloaca (F) de aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos na 24ª semana de idade

Richards (1977) observou que a temperatura corporal da ave é muito influenciada pela cobertura de penas, podendo ser maior ou menor dependendo do escore de empenamento apresentado pela ave. Porém, existe uma relação direta entre temperatura ambiente e empenamento, podendo interferir no metabolismo energético das aves. Peguri e Coon (1993)

observaram que a exigência de energia metabolizável para manutenção nas aves em ambiente de temperatura fria (12,8°C), com 0% de penas, foi duas vezes maior que as necessidades das aves em ambiente de alta temperatura (33,9°C) e 0% de penas.

Já Wylie et al. (2001) e Coelho (2003) não encontraram diferença do peso, comprimento e densidade das penas, em aves submetidas a temperaturas quente ou fria. Cooper e Washburn (1998) verificaram que o empenamento foi reduzido quando as aves foram expostas a uma temperatura de 32°C e Geraert et al. (1996) constataram que a redução no empenamento acontece somente quando a ave é exposta ao calor. Em contra partida, Edens et al. (2000) observaram melhora no empenamento em clima frio. Entretanto, os resultados das condições de empenamento foram satisfatórios, pois estavam condizentes com a temperatura ambiente, assim como os outros fatores analisados durante todo o período experimental.

3.5 Conclusões

- Confirmaram-se nitidamente nesse trabalho que os resultados da qualidade da cama, ninhos e amônia volatilizada apresentaram valores inferiores aos recomendados na literatura;
- Nenhuma ocorrência de pododermatite, do mesmo modo no empenamento das aves;
- O sistema de criação estudado apresentou resultados satisfatórios em relação às condições de bem-estar animal, fatos estes, aliados às perfeitas condições de conforto e estresse térmico.

Referências

APPLEBY, M.C.; HUGHES, B.O.; ELSON, H.A. **Poultry production systems: behaviour, management and welfare**. Wallingford: CAB International, 1992. 238 p.

ASHTON, W.L.G. Diseases in free range flocks. **State Veterinary Journal**, England, v. 42, n. 1, p. 48-54, 1988.

ARMSTRONG, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 2044-2050, 1994.

BAÊTA, F.C.; SOUZA, C.F. **Ambiência em edificações rurais: Conforto animal**. Viçosa: Edufv, 2010. 269 p.

BAIÃO, N.C. Quando o ambiente fica muito carregado. **Revista Aves e Ovos**, São Paulo, v.1, n.1. p. 20-22, 1996.

BARBOSA FILHO, J.D.A. **Avaliação do bem-estar de aves poedeiras de diferentes sistemas de produção e condições ambientais, utilizando análise de imagens**. 2004. 98 p. Dissertação (Mestrado em Física do Ambiente Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BARBOSA FILHO, J.A.D.; VIEIRA, F.M.C.; GARCIA, D.B.; SILVA, M.A.N.; SILVA, I.J.O. Mudanças e uso das Tabelas de Entalpia. Disponível em: <<http://www.nupea.esalq.usp.br/>>. Acesso em: 15 out. 2016.

BAREHAN, J.R. A comparison of the behavior and production of laying hens in experimental and conventional battery cages. **Applied Animal Ethology**, Amsterdam, v. 2, p. 291-303, 1976.

BERG, C.C. **Pododermatitis and hock burn in broilers. Measuring and auditing Broiler Welfare**. Wallingford: UK, 2004. 37 p.

BESSEI, W. Welfare of broilers: a review. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 62, n. 1, p. 455-466, 2006.

BLAKE, J.P. Managing and processing poultry manure. In: CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2000, Santiago. **Anais...** Santiago: SNA, 2000. p. 1-5.

BROOM, D.M. A history of animal welfare science. **Acta Biotheoretica**, Netherlands, v. 59, p.121-137, 2011.

CAMARGO, O.A.; VALADARES, J.M.A.S. Comportamento do manganês em Oxisol influenciado pela aplicação de carbonato de cálcio e sacarose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, n. 2, p. 71-75, 1980.

CARMON, L.G.; HUSTON, T.M. The influence of environmental temperature upon egg components of domestic fowl. **Poultry Science**, Champaign, v. 44, n. 5, p. 1237-1240, 1965.

CARR, L.E.; WHEATON, F.W.; DOUGLAS, L.W. Empirical models to determine ammonia concentrations from broiler chicken litter. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Islamabad, v. 33, n. 4, p. 1337-1342, 1990.

CLARK, J.A. **Environmental aspects of housing for animal production**. Northingham: British University of Northingham, 1981. 510 p.

COBB-VANTRESS, B. **Manual de manejo de frangos de corte**. Guapiaçu: Cobb Vantress, 2008. 66 p.

COELLO, C.L. **Feathering: an experimental study. Feathering manual**. Saint Louis: Novus® International, 2003. 56 p.

COOPER, M.A.; WASHBURN, K.W. The relationships of body temperature to weight gain, feed consumption and feed utilization in broiler under heat stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 237-242, 1998.

COUNCIL. Directive n. 2007/43/EC, de 28 de junho de 2007. Laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. **Official Journal of the European Union**, Reino Unido. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/animals/welfare/practice/farm/broilers_en>. Acesso em: 20 out. 2016.

CURTIS, S.E. **Enviromental management in animal agriculture**. The Iowa State University: Ames, 1983. 410 p.

EDENS, F.W.; CARTER, T.A.; PARKHURST, C.R.; SEFTON, A.E. Effect of selenium source and litter type on broiler feathering. **The Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 9, n. 3, p. 407-413, 2000.

ELLIOT, H.A.; COLLINS, N.E. Factor's affecting ammonia release in broiler houses. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Islamabad, v. 25, p. 413-424, 1982.

ESMAY, M.L. **Principles of animal environment**. West Port: AVI Publishing, 1979. 358 p.

HARMS, R.H.; DAMRON, B.L.; SIMPSON, C.F. Effect of wet litter and supplemental biotin and/or whey on the production of foot pad dermatitis in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 56, p. 291-296, 1977.

HARPER, L.A.; FLESCHE, T.K.; WILSON, J.D. Ammonia emissions from broiler production in the San Joaquin Valley. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, p. 1802-814, 2010.

HELLICKSON, M.A.; WALKER, J.N. **Ventilation of agricultural structures**. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers, 1983. 213 p.

HUGHES, B.O.; APPLEBY, M.C. Increase in bone strength of spent laying hens housed in modified cages with perches. **Veterinary Record**, London, v. 1, n. 24, p. 483-484, 1989.

HUMANE FARM ANIMAL CARE (HFAC). **Padrões do HFAC para a produção de frangos de corte**. Disponível em: <http://www.certifiedhumane.com/pdfs/Std04.Broilers.3A_po..pdf>. Acesso em: 7 out. 2016.

FISHER, C. **Fat deposition in broilers**. London: University of Nottingham, 1984. 470 p.

FOUAD, M.A.; RAZEK, A.H.A.; BADAWY, E.S.M. Broilers welfare and economics under two management alternatives on commercial scale. **Poultry Science**, Champaign, v. 7, p.1167-1173, 2008.

FRANCO JIMENEZ, D.J.; SCHEIDELER, S.E.; KITTOCK, R.J.; BROWN BRANDL, T.M.; ROBESON, L.R.; TAIRA, H.; BECK, M.M. Differential effects of heat stress in three strains of laying hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 16, p. 628-634, 2007.

FREEMAN, B.M. The domestic fowl in biomedical research: physiological effects of the environment. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 44, p. 44-60, 1988.

FURLAN, R.L.; MACARI, M. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funep, 2002. 376 p.

FURLAN, R.L. Influência da temperatura na produção de frangos de corte. In: 6º SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 2006, Chapecó. **Anais...** Chapecó: SBSA, 2006. p. 14-17.

FURTADO, D.A.; ROCHA, H.P.; NASCIMENTO, J.W.B.; SILVA, J.H.V. Índices de conforto térmico e concentração de gases em galpões avícolas no semiárido paraibano. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, p. 993-1002, 2010.

GATES, R.S. Regional variation in temperature index for poultry housing. **American Society of Agricultural Engineers**, Islamabad, v. 38, n. 1, p. 197-205, 1995.

GERAERT, P.A.; PADILHA, J.C.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **British Poultry Science**, London, v. 75, p. 195-204, 1996.

GLOBALGAP. **Pontos de controle e critérios de cumprimento: garantia integrada da fazenda - aves**. Cologne: Globalgap, 2007. 22 p.

GREENE, J.A.; McCracken, M.R.; EVANS, R.T. Contact dermatitis of Broilers - clinical and pathological findings. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 14, p. 23-28, 1985.

HERNANDES, R.; CAZETTA, J.V.O.; MORAES V.M.B. Frações nitrogenadas, glicídicas e amônia liberada pela cama de frangos de corte em diferentes densidade e tempos de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1795-1802, 2002.

HOWES, J.R.; GRUB, W.; ROLLO, C.A. Environmental temperature upon caged. **Science**, Washington, v. 40, n. 5, p. 1416-1417, 1961.

HVIDSTEN, H.; HAUGEN, A.E. Influence of temperature on laying performance. **Poultry International**, London, v. 1, p. 62-65, 1977.

KRISTENSEN, H.H.; BURGESS, L.R.; DEMMERS, T.G.H.; WATHES, C.M. The preferences of laying hens for different concentrations of atmospheric ammonia. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 68, p. 307-318, 2000.

KRUEGER, W.F. Importance of feathering in broilers and broiler breeders. **Ross Tech**, London, v. 1, p. 1191-1194, 1994.

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 144, p. 11-17, 2006.

MACARI, M.; FURLAN, R.L. **Ambiência na produção de aves de corte**. Piracicaba: Funep, 2001. 200 p.

MANNING, L.; CHADD, S.A.; BAINES, R.N. Key health and welfare indicators for broiler production. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 63, p. 46-62, 2007.

MARTLAND, M.F. Wet litter as a cause of plantar pododermatitis leading to foot ulceration and lameness in fattening turkeys. **Avian Pathology**, England, v. 13, p. 241-252, 1984.

MARTRENCAR, A.; MORISSE, J.P.; HUONNIC, D.; COTTE, J.P. Influence of stocking density on some behavioural, physiological and productivity traits of broilers. **Veterinary Research**, England, v. 28, p. 473-480, 1997.

McILROY, S.G.; GOODALL, E.A.; McMURRAY, C.H. A contact dermatitis of broilers - epidemiological findings. **Avian Pathology**, England, v. 16, p. 93-105, 1987.

McLEAN, K.A.; BAXTER, M.R.; MICHIE, W. A comparison of the welfare of laying hens in battery cages and in a perchery. **Research and Development in Agriculture**, New York, v. 3, p. 93-98, 1986.

MENEGALI, I.; TINÔCO, I.F.F.; ZOLNIER, S.; CARVALHO, C.D.; GUIMARÃES, M.C.D.C. Influence of different systems of minimum ventilation on air quality in broiler houses. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 32, n. 6, p. 1024-1033, 2012.

MIJS, A. Environmental consequences of intensive farming. **Poultry International**, London, v. 38, p. 36-38, 1999.

MIRAGLIOTTA, M.Y. **Avaliação dos níveis de amônia em dois sistemas de produção de frangos de corte com ventilação e densidade diferenciadas**. 2000. 112 p. Dissertação (Mestrado em Construções Rurais e Ambiente) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MITCHELL, M.A.; KETTLEWELL, P.J. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problems! **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 1803-1814, 1998.

MODREY, P.; NICHELMANN, M. Development of autonomic and behavioral thermoregulation in turkeys (*Meleagris gallopavo*). **Journal of Thermal Biology**, Amsterdam, v. 17, p. 287-292, 1992.

MOURA, D.J.; NÄÄS, I.A.; SILVA, I.J.O.; SEVEGNANI, K.B.; CORRIA, M.E. The use of enthalpy as a thermal comfort index. In: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 1997, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: SNA, 1997. p. 242-248.

MOWBRAY, R.M.; SYKES, A.H. Egg production in warm environmental temperatures. **British Poultry Science**, England, v. 12, p. 25-29, 1971.

NÄÄS, I.A.; MIRAGLIOTTA, M.Y.; BARACHO, M.S.; MOURA, D.J. Ambiente aérea em alojamento de frangos de corte: poeira e gases. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 326-335, 2007.

NATIONAL CHICKEN COUNCIL. National chicken council animal welfare guidelines and audit checklist. Washington: DC, 2010. 35 p.

NDEGWA, P.M.; HRISTOV, A.N.; AROGO, J.; SHEFFIELD, R.E. A review of ammonia emission mitigation techniques for concentrated animal feeding operations. **Biosystems Engineering**, San Diego, v. 4, p. 453-469, 2008.

OLANREWAJU, H.A.; PURSWELL, J.L.; COLLIER, S.D.; BRANTON, S.L. Effect of ambient temperature and light intensity on physiological reactions of heavy broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, p. 2668-2677, 2010.

ONBASILAR, E.E.; AKSOY, F.T. Stress parameters and immune response of layer under different cage floor and density conditions. **Livestock Production Science**, England, v. 95, p. 255-263, 2005.

PAGANINI, F.J. Manejo da cama. In: MENDES, A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004. cap.13, p.107-116.

PATTERSON, P.H. Management strategies to reduce air emissions: emphasis-dust and ammonia. **The Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 14, p. 638-650, 2005.

PAYNE, G.C. **Environmental temperature and egg production: the physiology of the domestic fowl**. Edinburgh: Horton-Smith, 1967. 235 p.

PEARSON, R.A. Prevention of foot lesions in broiler breeder hens kept in individual cages. **British Poultry Science**, England, v. 24, p. 183-190, 1983.

PEGURI, A.; COON, C.N. Development and evaluation of prediction equations for metabolizable energy and true metabolizable energy intake for Dekalb XL-Link White Leghorn hen. In: 49th MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE AND DEGUSSA TECHNOLOGY SYMPOSIUM, 1988, Blomington. **Proceedings...** Blomington: NCA, 1988. p.199-211.

QUINTEIRO-FILHO, W.M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M.L.; SAKAI, M.; SÁ, L.R.M.; FERREIRA, A.J.P.; PALERMO-NETO, J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, p. 1905-1914, 2010.

REECE, F.N.; BATES, B.J.; LOTT, B.D. Ammonia control in broiler houses. **Poultry Science**, Champaign, v. 58, p. 754-760, 1979.

RICHARDS, S.A. The significance of changes in the temperature of the skin and body core of the chicken in the regulation of heat loss. **The Journal of Physiology**, England, v.1, p.1-10, 1971.

SAMARA, M.H.; ROBINS, K.R.; SMITH, M.O. Interaction of feeding time and temperature and their relationship to performance of the broiler breeder hen. **Poultry Science**, Champaign, v.75, p.34-41, 1996.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System: user's guide**. Version 9.2 ed. Cary, 2010.

SINGH, A.; BICUDO, J.R.; TINÔCO, A.L.; TINÔCO, I.F.F.; GATES, R.S.; CASEY, K.D.; PESCATORE, A.J. Characterization of nutrients in built-up broiler litter using trench and random walk sampling methods. **The Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 13, p. 426-432, 2004.

- SAINSBURY, D.W.B. Health problems in intensive animal production. In: CLARK, J. A. **Environmental aspects of housing for animal production**. Londres: Butterworths, 1981, p.439-532.
- SHEPHERD, E.M.; FAIRCHILD, B.D. Foot pad dermatitis in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 10, p. 2043-2051, 2010.
- TANKSON, J.D.; VIZZIER-THAXTON, Y.; THAXTON, J.P.; MAY, J.D.; CAMERON, J.A. Stress and nutritional quality of broilers. **Poultry Science**, Oxford, v. 80, n. 9, p. 1384-1389, 2001.
- TAUSON, R.; JANSSON, L. Two alternative keeping methods for egg laying hens in comparison with furnished cages. In: PROCEEDINGS OF VIII EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 1990, Barcelona. **Anais...** Barcelona: WPSA, 1990. p. 676-679.
- TAUSON, R. Health and Production in Improved Cage Designs. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 1820-1827, 1998.
- TAYLOR, P.E.; NANCY, C.A.; COERSE, M.H. The effects of operant control over food and light on the behavior of domestic hens. **Applied Animal Behavior Science**, England, v. 71, p. 319-333, 2001.
- TEETER, R.G.; BELAY, T. Broiler management during acute heat stress. **Animal Feed Science Technology**, Gainesville, v. 58, p. 127-142, 1996.
- TERZICH, M. A amônia dos galpões avícolas e o pH da cama. In: CONFERÊNCIA AFINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABPPC, 1997. p. 141-146.
- TINÔCO, I.F.F. Avicultura industrial: novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 1-26, 2001.
- THOM, E.C. Colling degree: day air conditioning, heating, and ventilating. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Islamabad, v. 55, p. 65-72, 1958.
- VITORASSO, G.; PEREIRA, D.F. Análise comparativa do ambiente de aviários de postura com diferentes sistemas de condicionamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 6, p. 788-794, 2009.
- WATHES, C.M.; HOLDEN, M.R.; SNEATH, R.W.; WHITE, R.P.; PHILLIPS, V.R. Concentrations and emissions rates of aerial ammonia, nitrous oxide, methane, carbon dioxide, dust and endotoxin in UK broiler and layer houses. **British Poultry Science**, London, v. 38, n. 1, p. 14-28, 1998.
- WELFARE QUALITY[®]. **Assessment protocol for poultry**. Netherlands: ASG Veehouderij BV, 2009. 114 p.

WELKER, J.S.; ROSA, A.P.; MOURA, D.J.; MACHADO, L.P.; CATELAN, F.; UTTPATEL, R. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. **Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 37, n. 8, p. 1463-1467, 2008.

WYLIE, L.M.; ROBERTSON, G.W.; MACLEOD, M.G.; HOCKING, P.M. Effects of ambient temperature and restricted feeding on growth of feathers in growing turkeys. **British Poultry Science**, London, v. 42, p. 449-455, 2001.

YAHAV, S.; STRASCHNOW, A.; LUGER, D.; SHINDER, D.; TANNY, J.; COHEN, S. Ventilation, sensible heat loss, broiler energy, and water balance under harsh environmental conditions. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 253-258, 2004.

YALÇIN, S.; SETTAR, P.; OZKAN, S.; CAHANER, A. Comparative evaluation of three commercial stocks in hot vs temperate climates. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, p. 921-929, 1997.

4 PADRÃO COMPORTAMENTAL E FISIOLÓGICO DE GALINHAS POEDEIRAS MANTIDAS NO SISTEMA FREE-RANGE LIVRE DE ANTIBIÓTICOS

Resumo

Conhecer e garantir o bem-estar dos animais no sistema de criação é importante, pois afeta diretamente na produção. O propósito deste trabalho foi avaliar o comportamento e o estresse de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos a partir de análises fisiológicas dos níveis de corticosteronas. O estudo foi conduzido em um galpão comercial de galinhas poedeiras da linhagem Lohmann Brown. O período experimental correspondeu da 18ª a 24ª semanas de idade. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. O estudo comportamental dos animais foi realizado em três períodos distintos: manhã (08h30min às 09h30min), intermediário (12h00min às 13h00min) e tarde (15h30min às 16h30min), semanalmente, na área interna e externa do galpão. Do mesmo modo, foram realizadas as aferições da temperatura superficial da pele e frequência respiratória. Para a análise do hormônio corticosterona, amostras de excretas foram coletadas e posteriormente analisadas pela técnica de radioimunoensaio. Comportamentos naturais, sociais, alimentar, reprodutivo, estresse, investigativo, locomoção, exploratório e descanso destacaram-se no período da manhã na área interna do galpão. Os mesmos comportamentos supracitados prevaleceram no período da tarde na área externa. Comportamentos de manutenção prevaleceram no período da tarde em ambas as áreas estudadas, do mesmo modo a expressão comportamental social foi maior no período intermediário. O efeito da interação entre período de observação e idade das aves foi significativo sobre a temperatura da crista, barbeta e canela. Os níveis de corticosterona foram significativamente inferiores. Avaliações comportamentais, fisiológicas, ligadas à sanidade e à produção, quando associadas, constituem ferramentas eficientes no julgamento do bem-estar dos animais. Contudo, o sistema de produção corroborou para o conforto e bem-estar das aves poedeiras.

Palavras-chave: Bem-estar animal; Comportamento; Corticosterona; Sistema free-range

Abstract

Know and secure the welfare of animals in the breeding system is important as it directly affects production. The purpose of this work was to evaluate the behavior and stress of laying hens created in the free-range antibiotic-free system from physiological analyzes of corticosterone levels. The study was conducted in a commercial shed of laying hens of the lineage Lohmann Brown. The experimental period it was understood the 18th to 24th week of age. Water and feed were supplied *ad libitum*. The animal behavioral study was realized out in three different periods: morning (08:30 a.m. to 9:30 p.m.), intermediate (12:00 a.m. to 13:00 p.m.) and afternoon (15:30 a.m. to 16:30 p.m.), weekly, in the internal and external area of the shed. Similarly, measurements were realized of skin surface temperature and respiratory rate. For the analysis of the hormone corticosterone, excreta samples were collected and later analyzed by the radioimmunoassay technique. Behaviors naturals, social, feed, reproductive, stress, investigative, locomotion, exploratory and rest were highlighted in the morning in the internal area of the shed. The same behaviors mentioned above prevailed in the afternoon in the external area. Maintenance behaviors prevailed in the afternoon in both areas studied, likewise the social behavioral expression was higher in the intermediate period. The effect of the interaction between period of observation and age of birds was significant on the temperature of the ridge, barb and cinnamon, despite the differences between the regions evaluated, they presented values below the recommended. Corticosterone levels were

significantly lower. Assessments behavioral, physiological, connected the sanity and production assessments, when associated, are efficient tools in the judgment of animal welfare. However, the production system corroborated for the comfort and well-being of laying birds.

Keywords: Animal welfare; Behavior; Corticosterone; System free-range

4.1 Introdução

Os avanços nas áreas de nutrição, manejo (incluindo instalações e equipamentos) e genética, desencadearam granjas comerciais de aves de corte e postura a desenvolverem criações de animais de forma intensiva, caracterizando uma situação definida como indústria da produção animal. Não há dúvidas que essas condições têm proporcionado ganhos econômicos e sociais importantes, mas também têm proporcionado problemas sérios quanto ao bem-estar animal.

Cabe ressaltar que é possível desenvolver novas práticas na criação que assegurem bons índices de produtividade e alta qualidade do produto, sem colocar o bem-estar dos animais em risco. Para tanto, precisamos aprofundar o conhecimento sobre a biologia da espécie de interesse e definir limites éticos para nortear quais práticas a serem banidas e recomendadas.

Logo, o bem-estar animal consiste em o estado de um indivíduo do ponto de vista de suas tentativas de adaptação ao ambiente (BROOM, 2011). Isto é, se refere o quanto tem de ser feito para o animal conseguir adaptar-se ao ambiente e o grau de sucesso com que isto está acontecendo. Importante ressaltar que para compreendermos melhor o conceito de bem-estar, faz necessário entender também o conceito de homeostase. A manutenção do meio interno do organismo em equilíbrio se dá por intermédio de uma série de sistemas funcionais de controle, envolvendo mecanismos fisiológicos e reações comportamentais (CANNON, 1929), mantendo estável, por exemplo, a temperatura corporal, o balanço hídrico, as interações sociais, etc. O bem-estar é prejudicado quando o animal não consegue manter a homeostase ou quando ele consegue mantê-la à custa de muito esforço.

CrITÉRIOS científicos vêm sendo utilizados na tentativa de avaliar o bem-estar animal, por meio da medição dos custos arcados pelo organismo para se ajustar ao seu ambiente. Pela complexidade dos processos adaptativos, a avaliação do bem-estar envolve uma abordagem multidisciplinar, que considera as características ambientais, variáveis fisiológicas, sanidade, produtividade e a preferência dos animais pelos diversos componentes do ambiente que os rodeiam (BROOM, 1991; MENCH, 1992; DE PASILLÉ; RUSHEN, 2005).

O comportamento também pode ser usado na avaliação do bem-estar. O fato de um animal apresentar alterações de comportamento fornece informações sobre quanto ao seu estado de conforto e, conseqüentemente, sobre seu bem-estar (BROOM; MOLENTO, 2004). O animal busca situações que lhe sejam benéficas, escolhendo entre várias opções, ou seja, a que demanda menor consumo de energia.

Diante do contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o comportamento e o estresse de aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos a partir de análises fisiológicas dos níveis de corticosteronas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local e período experimental

A pesquisa foi conduzida na fazenda, onde está sediada a empresa Korin Agropecuária Ltda e o Centro de Pesquisa Mokiti Okada, em parceria com o Departamento de Engenharia de Biossistemas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Situada no município de Ipeúna - São Paulo, a fazenda apresenta latitude sul 22°26'09'', 47°43'08'' de longitude oeste e uma altitude média de 635 metros. Segundo a classificação de Köppen, o clima é do tipo Cfa (subtropical úmido) com temperatura média anual de 18,1°C e 1.500 mm de precipitação anual acumulada. O período experimental compreendeu-se nos meses de julho, agosto e setembro de 2015, durante as fases de pré-postura e postura (18^a a 24^a semanas de idade).

4.2.2 Instalações, aves e manejo

A execução da pesquisa procedeu-se em um galpão comercial de aves postura, na orientação sudeste-noroeste (124° SE e 310° NW). Importante ressaltar que as instalações, assim como o manejo realizado diariamente na granja respeitam as normas vigentes estabelecidas pela *Humane Farm Animal Care* (HFAC), sendo um rigoroso protocolo de certificação conferido às empresas produtoras que implantam e seguem normas com relação ao bem-estar animal. Normas estas que asseguram uma alimentação equilibrada, livre de antibióticos, abrigos e área de repouso para os animais onde podem manifestar o comportamento natural de sua espécie. As características do galpão foram as seguintes:

- Dimensões do galpão: 9,85 metros de largura x 70,0 metros de comprimento e pé direito de 3,00 metros. Cobertura com telhas de fibrocimento, beiral de 0,60 m e paredes de alvenaria;
- Muretas laterais de alvenaria de 60 cm de altura, telado e providos com cortina s laterais acionadas manualmente. Equipados com ventiladores e sistema de nebulização automático;
- Piso de concreto coberto com cama de maravalha (8 cm de altura) e ninhos distribuídos ao longo da extensão do galpão na proporção de 1:6 aves poedeiras e poleiros;
- Comedouros tipo calha automático e bebedouros pendulares. A distribuição dos comedouros, bebedouros e a área do poleiro foram ajustados pelo número de aves alojadas,
- Área de piquete (pastagem) e árvores, cercadas com tela de alambrado ao redor do galpão.

As pintainhas de um dia foram obtidas do incubatório Hygen Genética Avícola Ltda, município de Rio Claro/SP. Estas permaneceram durante a fase de cria e parte da recria em outro galpão na empresa Korin Agropecuária Ltda, em piso de concreto, coberto com cama de maravalha, alimentadas com rações formuladas à base de produtos exclusivamente de origem vegetal, sem adição de antibióticos e quimioterápicos.

A prática de debicagem foi efetuada de forma diferenciada do sistema convencional, ou seja, no período compreendido entre 90 dias de idade, as aves foram submetidas a um desgaste da ponta afiada dos bicos, sendo realizada uma apara leve no bico da ave para evitar que este cresça exageradamente e dificulte o consumo do alimento. Esta apara é diferente da debicagem realizada no sistema convencional, pois não realiza o corte severo e consiste uma única vez, de acordo com as normas da HFAC.

Na 13^a semana de idade as aves foram transferidas para o galpão comercial da própria empresa. Portanto, foram alojadas 5.098 aves poedeiras da linhagem Lohmann Brown na densidade de 7,28 aves/m². Durante todo o período experimental água e ração foram fornecidas *ad libitum*, ressaltando que a ração formulada consistia sem adição de antibióticos e quimioterápicos. De acordo com as práticas de manejo estabelecidas pela empresa, as coletas dos ovos eram efetuadas duas vezes ao dia da 15^a a 22^a semanas de idade das aves, e posteriormente as coletas passaram a ser realizadas três vezes ao dia. Os animais permaneciam livres no galpão e tinham acesso à área ao piquete (Figura 1). No final do dia as

mesmas eram acondicionadas no interior do galpão e soltas novamente ao amanhecer no dia seguinte.

Figura 1 - Animais no interior do galpão (A) e com acesso ao piquete (B)

4.2.3 Etapas da pesquisa

4.2.3.1 Avaliações dos parâmetros fisiológicos

4.2.3.1.1 Frequência respiratória

A frequência respiratória foi registrada pela contagem do número de movimentos abdominais realizados pela ave por um período de 15 segundos. Utilizou-se um cronômetro digital para marcar o tempo despendido para contagem, em seguida o valor foi multiplicado por 4 para obter o número de movimentos realizados em 1 minuto. A medição deste parâmetro foi realizada durante todo o período experimental, uma vez por semana, nos seguintes horários: 08h30min, 11h30min e 14h30min horas. Os animais foram selecionados aleatoriamente, perfazendo 45 aves.

4.2.3.1.2 Temperatura superficial

Após o registro da frequência respiratória das aves selecionadas foram aferidos os dados de temperatura da superfície do animal, das mesmas aves observadas na análise da frequência respiratória. As temperaturas da crista, barbela e canela foram realizadas por intermédio de um Termômetro Digital Infravermelho, mira laser, modelo GM-300, faixa de temperatura (-50° a 380°C) e precisão de $\pm 1,5$ graus. Utilizou-se o termômetro por se tratar de

medida não invasiva.

4.2.3.2 Avaliações comportamentais

Para avaliar a importância da expressão corporal em função do bem-estar, é necessário um entendimento de quais comportamentos são importantes para as aves. Sendo assim, foi elaborado um etograma (Tabela 1) com base nas observações preliminares no local do estudo e de acordo com estudos realizados por Taylor et al. (2001), Jendral (2005), Alves et al. (2004), Rudkin e Stewart (2003), Mollenhorst et al. (2005).

As observações comportamentais foram realizadas semanalmente pelo pesquisador treinado, em três períodos (matutino, compreendido entre os horários das 08h30min às 09h30min, e vespertino das 12h00min às 13h00min; e 15h30min às 16h30min), horários esses selecionados por conduzir possíveis mudanças comportamentais identificáveis.

Salienta-se que antes de iniciar o registro dos dados o pesquisador ingressava no galpão, aguardava por um período de aproximadamente 40 minutos para a adaptação das aves *versus* pesquisador, e após este intervalo iniciava-se as avaliações.

A metodologia adotada neste estudo foi por amostragem instantânea “*snapshots*” ou “*instantaneous samplings*” na qual se desejava anotar o comportamento de um grande grupo de indivíduos (DEL-CLARO, 2004). Esta consiste em avaliar as situações exibidas pelos indivíduos no decorrer de um minuto, e em seguida anotando os atos comportamentais em uma lista de comportamentos (etograma).

Tal avaliação permitiu checar quantos indivíduos estavam executando cada comportamento da lista através de “*snapshots*”, amostragens instantâneas seguindo item por item da lista. Ao final da primeira checagem obteve-se um intervalo de tempo fixo (5 minutos) para o início do próximo censo, dentro da mesma sessão de observação no decorrer de uma hora, conforme os horários supracitados. Cabe ressaltar que todo o procedimento foi realizado em dias não coincidentes com as aferições das variáveis fisiológicas a fim de evitar interferências.

Tabela 1 - Etograma comportamental elaborado para galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Categorias comportamentais	Comportamentos	Descrição
Comportamento Natural	Bater as asas	Movimento em que a ave bate as duas asas.
	Bicar objetos	Bicagem direcionada a objetos, com exceção ao bebedouro ou comedouro.
	Ciscar	A ave caminha de cabeça baixa a procura de invertebrados e pedras pequenas no solo/cama. Por vezes ela raspa a superfície do lugar com as garras e dá um ou dois passos para trás a fim de observar alguma possível presa que estava submersa.
	Esticar as asas	Comportamento em que a ave estica as asas.
	Procurar sombra	A ave caminha no piquete em busca de sobras, embaixo de árvores ou arbustos.
Comportamento investigativo	Investigar penas	Quando a ave investiga suas próprias penas com o bico ou de sua companheira.
Comportamento exploratório	Visitar os ninhos	Aves visitando os ninhos e vocalizando “cóocóocó”.
Comportamento de estresse	Bicar agressivo	Bicagem forte de outra ave provocando reação agressiva ou defensiva, geralmente direcionada à região superior da cabeça e cristas ou na região inferior dorsal do pescoço e cloaca.
	Brigar	Ação de uma ave bicar qualquer parte do corpo de outra ave de forma agressiva.
	Canibalismo	Aves começam bicar os dedos entre elas, ou quando uma ave machucada torna-se alvo de suas companheiras que buscam pelo sangue de algum ferimento.
Comportamento alimentar	Capturar insetos	A ave sai para forragear no piquete ou caminha sobre a cama/piso, à procura de insetos, uma vez encontrado a ave o captura e come.
	Comer	Ato em que a ave se posiciona na frente do comedouro e come ração.
	Beber	Com o corpo em posição neutra a ave mergulha o bico na água/bebedouro e rapidamente ergue a cabeça para deglutir a água coletada.
	Forragear	Consumindo e/ou bicando o substrato vegetal na área do piquete.
Comportamento reprodutivo	Permanência no ninho	A ave permanece sentada no ninho em estado de observação ao seu redor.
	Reflexo de monta sem galo	Quando uma ave se aproxima da companheira e esta se abaixa.
	Postura	A ave fica sentada no ninho com a comprovação da presença de ovo.
Comportamento social	Interagir	Interação entre as aves positivamente como investigar penas, empoleirar, forragear, bicar objetos, etc.
	Perseguir	Ato em que uma ave corre atrás de outra.

	Bicar não agressivo	Bicando levemente outras aves, geralmente na região inferior ventral do pescoço, dorso, base e ponta da cauda e abdômen.
	Vocalizar	A ave mantém a postura ereta e permanece em postura de alerta. A cabeça permanece imóvel e o bico abre para emitir o som “cóooocóocóo”.
Comportamento de locomoção	Caminhar	Com passos ritmados, a ave projeta a cabeça para frente seguida do corpo.
	Correr	A ave corre batendo ou não as asas com o pescoço distendido e o corpo inclinado para frente.
	Empoleirar	Comportamento em que a ave sobe e permanece sobre o poleiro.
	Voar	Sobre as duas patas inclina-se para frente para gerar impulso, bate as asas para levantar voo.
Comportamento de manutenção	Banho de areia	Revolvendo-se no substrato de cama ou no solo na área do piquete, espalhando-o pelo corpo.
	Banho de sol	A ave fica exposta ao sol, e as asas e a cauda permanecem ligeiramente abertas. Outras se inclinam durante os banhos de sol, com a asa do lado oposto levantada de tal forma que a parte inferior esteja totalmente exposta.
	Coçar a cabeça	A ave ergue uma das patas com os dedos entreabertos até a altura do peito e mantém a cabeça voltada para o lado, coça a região do dorso da cabeça, região perioftálmico, pescoço ou ouvido.
	Esticar pernas e asas	A partir da posição neutra, a ave ergue o corpo, distende o pescoço para frente e estica a pata e a asa para a lateral voltada um pouco para baixo; o corpo é levemente inclinado para o lado oposto a fim de manter o equilíbrio. A cauda é aberta em forma de leque. É bastante visível o esforço que a ave faz para distender a musculatura de todo o corpo, incluindo a dos dedos.
	Limpar bico	A ave raspa, alternadamente, as laterais do bico contra o poleiro ou a cama.
	Sacudir e ruflar as penas	A ave eriça as penas da cabeça, pescoço, peito, ventre e dorso e as sacode em semicírculos curtos e rápidos.
Comportamento de descanso	Deitar	Ave em estado de repouso, com o peito e a cabeça apoiada sobre a cama.
	Descansar	Ave mantém uma das pernas esticada, encolhe a outra e permanece na posição neutra.
	Dormir	Em posição neutra com uma das patas recolhida sob as penas do ventre, a ave volta a cabeça para o dorso e esconde o bico e cera na plumagem eriçada do mesmo.
	Posição neutra	A ave mantém as pernas paradas e levemente afastadas; a cauda apresenta-se caída e as asas junto ao corpo.
	Sentar	Comportamento caracterizado quando o corpo da ave está em contato com o piso, solo ou cama.

4.2.3.3 Análise de corticosterona

Durante o período experimental foram realizadas duas coletas de excretas dos animais, material esse escolhido por constatar grande quantidade de hormônios (esteróides) ligados ao estresse como os andrógenos, estrógenos e progestágenos; glicocorticóides (corticosteroides), cortisol e dehidroepiandrosterona e mineralocorticoides. Esse método tem demonstrado uma importante ferramenta para o monitoramento do bem-estar dos animais por ser não invasivo (LUNDBERG, 2005; McKENZIE; DEANE, 2005).

Para a coleta das amostras foram distribuídos plásticos resistentes em pontos estratégicos no galpão (Figura 2). O pesquisador aguardava a ave evacuar para então coletar a amostra rapidamente, em seguida as mesmas acondicionadas em tubos de eppendorf e alocadas no gelo. Lembrando que, para a realização desta coleta foi adotada todas as medidas necessárias de higiene a fim de evitar contaminações nas amostras. Após a coleta previamente identificada, as mesmas foram mantidas em freezer -90°C até a análise.

Figura 2 - Coleta de excretas na área interna (A) e externa (B) do galpão

Para a extração dos metabólitos de corticosterona cada amostra de excretas foi previamente descongelada, na sequência pesada uma alíquota de 0,5 g em balança analítica e adicionadas 5,0 mL de etanol a 90%. Em seguida as amostras foram agitadas em aparelho vortex por 15 minutos, depois centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para microtubos de polipropileno de 1,5 mL devidamente identificados e armazenados em freezer a -90°C para serem posteriormente dosados. Metabólitos fecais de corticosterona foram quantificados através da técnica de radioimunoensaio (I^{125} RIA) duplo anticorpo por meio de conjunto de diagnóstico comercial 11-Desoxycortisol[®] - RIA- CT.

4.2.3.4 Análises estatísticas

A frequência de comportamentos nas áreas interna e externa do galpão foi analisada em função das variáveis independentes: idade das aves (em semanas) e horário (08h30min às 09h30min, 12h00min às 13h00min e 15h30min às 16h30min). Os dados foram analisados através de modelos lineares generalizados (glm) assumindo distribuição Poisson. Quando houve superdispersão dos dados foi utilizada a distribuição Quasi-poisson. A adequação (ajuste) dos modelos aos dados foi avaliada através de gráficos de probabilidade “half-normal” com simulação envelope. Quando constatada significância das variáveis, as comparações foram feitas através do teste de Wald.

Com relação à temperatura da crista, barbela e canela foram analisadas em função das variáveis independentes: idade das aves (em semanas) e o mesmo horário supracitado através de análise de variância (ANOVA - Two way). Quando significativos os efeitos das variáveis explanatórias, as médias foram comparadas através do teste Tukey. Já para a frequência respiratória os dados foram analisados através de modelos lineares generalizados (glm) assumindo distribuição Poisson. Quando constatada significância das variáveis, as comparações foram feitas através do teste de Wald.

Os níveis de corticosterona foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA - One way). Para as análises, foi utilizada a transformação logarítmica dos dados de cortisol. Quando significativos o efeito dos tratamentos, as médias foram comparados através do teste Tukey. A adequação (ajuste) do modelo aos dados foi avaliada através de gráficos de probabilidade “half-normal” com simulação envelope. A adequação (ajuste) de ambos modelos aos dados foi avaliada por intermédio de gráficos de probabilidade “half-normal” com simulação envelope. As análises estatísticas das variáveis estudadas foram feitas por intermédio do software R.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Temperatura superficial e frequência respiratória

Na Tabela 2 apresentam as médias dos valores das temperaturas referentes à crista, barbela e canela das aves mensuradas semanalmente.

Tabela 2 - Médias da temperatura da crista, barbela e canela (°C) de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Idade das aves (semanas)	Temperatura da Crista (°C)		
	08h30min	11h30min	14h30min
18	32,12 (±2,31) Aa	31,63(±1,74) Aab	33,84 (±1,77) Ba
19	31,47 (±1,51) Aac	33,18 (±1,72) ABbcd	34,06 (±1,55) Ba
20	33,16 (±2,76) Aa	43,29 (±1,79) Ad	33,93 (±1,76) Aa
21	29,54 (±2,71) Ab	30,83 (±2,62) Aa	32,71 (±1,86) Ba
22	33,20 (±1,63) Aa	34,32 (±1,75) ABcd	34,94 (±1,50) Ba
23	30,73 (±1,45) Abc	31,13 (±1,60) Aa	31,99 (±1,51) Ab

Idade das aves (semanas)	Temperatura da Barbela (°C)		
	08h30min	11h30min	14h30min
18	27,21 (± 2,21) Ab	28,29 (±1,49) Aa	30,31 (±1,38) Ba
19	25,40 (±2,96) Aa	27,80 (±2,12) Bab	29,23 (±1,4) Ba
20	27,90 (±2,59) Ab	29,37 (±1,97) Abc	29,06 (±2,27) Aa
21	20,88 (±2,17) Ac	22,98 (±2,15) Bd	25,34 (±1,81) Cb
22	26,50 (±2,61) Aab	31,00 (±1,80) Bc	30,72 (±2,66) Ba
23	21,42 (±1,42) Ac	22,54 (±1,74) Ad	25,28 (± 1,61) Bb

Idade das aves (semanas)	Temperatura da Canela (°C)		
	08h30min	11h30min	14h30min
18	28,12 (±3,04) Aa	29,87 (±1,89) Aa	31,11 (±1,94) Aa
19	28,31 (±3,06) Aa	29,65 (±2,43) ABa	31,81 (±2,62) Ba
20	29,28 (±3,07) Aa	30,72 (±3,68) Aa	30,40 (±3,75) Aa
21	21,90 (±3,26) Ac	24,32 (±2,80) ABb	26,70 (±2,68) Bb
22	28,23 (±3,64) Aab	32,24 (±2,93) Ba	32,34 (±2,86) Ba
23	23,04 (±2,37) Ac	23,60 (±2,52) Ab	25,18 (±1,27) Ab

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$, Teste Tukey) na comparação entre colunas (semanas) e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$, Teste Tukey) na comparação entre as linhas (temperatura)

Com base nos resultados, podemos inferir que o efeito da interação entre período de observação e idade das aves foi significativo sobre a temperatura da crista ($F_{9,493}=3.059$, $P=0.00141$), barbela ($F_{9,493}=5.901$, $P<0.001$) e canela ($F_{9,493}=3.031$, $P=0.00154$). Apesar dos resultados terem demonstrado diferença estatisticamente na presente pesquisa, os mesmos encontram-se abaixo dos valores recomendados pela literatura independente do horário avaliado. Segundo Shevel'ko (1967) e Hester et al. (2005) a temperatura ideal da crista para

galinhas poedeiras corresponde 34,5°C à 35,9°C, barbela 34,5°C à 35°C e canela 37°C à 37,5°C.

Importante ressaltar que a temperatura do ambiente assim como a umidade relativa do ar corroborou com os resultados da temperatura superficial e frequência respiratória, uma vez que estas registraram valores dentro da faixa de termoneutralidade recomendado para aves poedeiras adultas (FREEMAN, 1988). Durante o período experimental a temperatura máxima registrada foi de 25,89 °C e a mínima de 14,89 °C, e a umidade relativa do ar corresponderam 89,9% (máxima) e 51,72 % (mínima).

Sabe-se que as aves mantêm a temperatura corporal constante quando a temperatura ambiente é termoneutra. Em condições de alta temperatura, os animais precisam de mecanismos físicos, como o resfriamento evaporativo e a redução do consumo de alimentos. O aumento na temperatura corporal das aves é resultado de um desbalanceamento entre a perda de calor por meios evaporativos e sensíveis e a produção de calor (BROWN-BRANDL et al., 1997). Porém, outro fator importante na termorregulação das aves é a presença dos apêndices como a crista, barbela e canela, o qual em períodos de estresse térmico estas extremidades normalmente são vaso dilatadas (RICHARDS, 1971; HILLMAN et al., 1982). Dahlke et. al (2005) calcularam que a área total de superfície da crista, barbela e canelas das aves corresponde a 16% da superfície total do corpo, o que reflete a importância dessas regiões corporais na dissipação de calor pelas aves.

Nääs et al. (2010) verificaram que a temperatura da crista, barbela e canela em frangos de corte no período da manhã correspondeu entre 39,0°C; 39,5°C e 39,5°C, e no período da tarde 40,0°C; 39,5°C e 41°C respectivamente. Santos (2009) registrou valores de 33°C a 34,3°C na crista, 34,4°C a 35,5°C na barbela e 34,3°C na canela em sistema de produção para frangos de corte tipo caipira. Já Camerini et al. (2013) em estudos realizados com galinhas poedeiras, constataram que a temperatura da canela foi 34,5°C de aves criadas em gaiola enriquecida e 36,2 à 38,7°C no sistema free-range livre de antibióticos no sistema free-range livre de antibióticos, resultados estes que diferem do estudo em questão.

Em outro estudo realizado por Garcia et al. (2015) com galinhas poedeiras mantidas em gaiolas em diferentes densidades populacionais, os autores concluíram que as médias da temperatura da crista no período da manhã foi de 33,96°C e a tarde 35,35°C. Com relação à temperatura da barbela encontraram valores de 27,79°C (manhã) e 30,36°C (tarde), e da canela 34,3°C (manhã) e 35,4°C (tarde). Podemos inferir que os resultados da temperatura da crista e barbela da presente pesquisa aproximou-se dos valores encontrados no trabalho

supracitado, diferentemente da temperatura da canela que apresentou resultados satisfatórios em comparação ao estudo de Garcia et al. (2015).

Na Tabela 3 representa os resultados referentes à avaliação da frequência respiratória das aves.

Tabela 3 - Valores médios da frequência respiratória (mov./min) de aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Idade das aves (semanas)	Frequência Respiratória (mov./min)		
	08h30min	11h30min	14h30min
18	20,56 ($\pm 5,12$)	20,67 ($\pm 1,78$)	20,27 ($\pm 2,47$)
19	20,53 ($\pm 5,25$)	19,73 ($\pm 2,68$)	21,07 ($\pm 3,04$)
20	20,00 ($\pm 2,49$)	20,27 ($\pm 2,68$)	19,73 ($\pm 3,04$)
21	18,80 ($\pm 2,07$)	18,67 ($\pm 2,35$)	18,53 ($\pm 2,15$)
22	19,47 ($\pm 2,47$)	21,60 ($\pm 5,04$)	22,80 ($\pm 6,02$)
23	19,07 ($\pm 2,63$)	17,47 ($\pm 2,15$)	17,73 ($\pm 1,95$)
Total	19,73 ($\pm 3,34$) a	19,71 ($\pm 2,78$) a	20,01 ($\pm 3,10$) a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$, teste de Wald) na comparação entre as linhas (horário)

Observou-se que o efeito da idade das aves não foi significativo sobre a variação da frequência respiratória. Embora o efeito do período de observação tenha sido significativo sobre a frequência respiratória das aves ($P = 0,4602$), a frequência respiratória observada não apresentou diferença significativa entre os diferentes horários de observação.

Segundo Linsley e Berger (1964) a frequência respiratória em frangos de corte se situa em torno 25 movimentos por minuto em ambiente de conforto térmico. Quando submetidas ao estresse por calor agudo, a frequência aumenta em torno de 250 movimentos por minuto. Em galinhas poedeiras, a frequência respiratória pode variar de 23 movimentos por minuto em ambiente de conforto térmico a 273 movimentos por minuto em situações de temperaturas elevadas (KASSIM; SYKES, 1982).

O aumento da frequência respiratória nas aves corresponde o mecanismo termorregulatório eficiente em temperatura ambiente elevada (OLIVEIRA NETO, 2000). Quando há aumento da temperatura do ar acima do conforto térmico, a dissipação de calor por radiação, condução e convecção diminui e a evaporação torna-se o principal processo de dissipação de calor (TEETER, 1994), e consequentemente os animais entram em estado ofegante.

Estudos realizados por Amaral et al. (2011) com frangos de corte mantidos em galpão comercial apresentaram valores médios de frequência respiratória 68 mov./min, valores estes considerados estressante para aves. Silva et al. (2001) observaram que em condição termoneutra (24°C e 65% UR), aves com 42 dias de idade apresentaram valores médios de frequência respiratória de 83 mov./min. Por outro lado, em temperaturas ambientais mais elevadas (35°C), Frankel et al. (1962) e Kassim e Sykes (1982) observaram valores de frequência respiratória de 150 a 260 mov./min. Castilho et al. (2015) verificaram que galinhas poedeiras em diferentes densidades mantidas em gaiolas apresentaram valores de frequência respiratória entre 28 a 36 mov/min. durante vários períodos do dia.

Portanto, as médias da frequência respiratória, assim como a temperatura superficial obtidas no presente estudo demonstraram que em situações de termoneutralidade as aves não necessitam utilizar intensamente os mecanismos como a ofegação para manter a temperatura corporal constante. Importante ressaltar que as aves do presente estudo estavam na faixa de conforto térmico ideal (ITU) o qual corresponderam entre 60 a 72, valores estes abaixo do recomendado pela literatura para a criação de aves de postura, que correspondem 71 a 75°C (ARMSTROG, 1994; GATES, 1995). Todavia, o sistema de criação em questão demonstrou resultados satisfatórios em relação à frequência respiratória das aves, pois os resultados estão abaixo dos parâmetros de referência mencionados por Kassim e Sykes (1982). Sendo assim, resultados encontrados no presente estudo demonstraram que as aves mantiveram sua temperatura corporal dentro dos padrões fisiológicos ideais.

4.3.2 Expressões comportamentais

As proporções de comportamento natural e alimentar realizadas por galinhas poedeiras na área interna do galpão estão demonstradas na Figura 3 por meio da ferramenta gráfica heatmap. Esta ferramenta é uma forma útil de representar dados que naturalmente se alinha a dados numéricos em uma grade bidimensional, onde o valor de cada célula na grade é representado por uma cor.

Observou-se que a frequência dos comportamentos ciscar (37%), bater as asas (46%), beber (53%) e comer (58%) foram mais frequentes no período 3. Já as atividades bicar objetos (3%), esticar as asas (9%) e capturar insetos (2%) se destacaram no período 1 por conseguinte no período 2, com exceção o comportamento esticar as asas. Adicionalmente os comportamentos registrados na área externa do galpão (Figura 4) demonstraram que a frequência comportamental ciscar (47%), esticar as asas (6%), bater as asas (30%), forragear

(44%) e capturar insetos (48%) prevaleceu no período 1. O comportamento bicar objetos predominou no período 2 (13%) e as atividades beber e comer foram iguais a área interna do galpão. Ressalva-se que as médias da temperatura nos dias das observações comportamentais variam entre 18°C a 25°C e a umidade relativa de 54% a 79%, fator este que corroborou com a expressão comportamental das aves por apresentarem condições de conforto térmico.

Sabe-se que o ambiente ao qual a ave está submetida influencia fortemente no comportamento (FERRANTE et al., 2001; DAWKINS, 2004), pois o mecanismo de homeostase somente é eficiente quando as temperaturas estão próximas. Adquirindo-se o conhecimento de como este ambiente atua sobre a homeostase é possível identificar, quantificar e caracterizar as condições de conforto térmico e bem-estar (PEREIRA et al., 2007). As aves, quando estão em estresse, alteram seu comportamento para auxiliar na manutenção da temperatura corporal dentro de limites normais (PEREIRA et al., 2007). Assim dependendo da condição bioclimática do ambiente em que este animal está inserido, podem ser visualizados comportamentos considerados normais ou mesmo apresentar desvios por estresse calórico.

Estudos mostram diminuição no consumo de ração e maior ingestão de água quando as aves estão em ambientes acima a zona de termoneutralidade, além de aumentarem a frequência de bicar (ALVES, 2006; RODRIGUES, 2006; SILVA et al., 2006; BARBOSA FILHO et al.; 2007), porém não foi o caso da presente pesquisa, apesar do maior consumo de ração e água tenha ocorrido no período 3, as aves estavam em conforto térmico.

Figura 3 - Padrão de frequência do comportamento natural e alimentar observado em galinhas poedeiras na área interna do galpão

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 4 - Padrão de frequência do comportamento natural e alimentar observado em galinhas poedeiras na área externa do galpão

Galinhas poedeiras criadas no sistema em gaiolas apresentam um aumento no consumo de ração, característica esta dos animais quando submetidos às condições de confinamento (HUGHES; DUNCAN, 1988) já que não possuem alternativa para passar o tempo. Logo, no sistema de criação desta pesquisa foi disponibilizado um ambiente enriquecedor, disponibilizando outras opções às aves, ou seja, observou-se uma distribuição maior nas porcentagens de tempo gasto em outras atividades. Abd El-Hack et al. (2017) relatam que as aves alimentam-se mais no início ou no final do dia, ou em ambos, mas não ao meio dia. O autor ainda comenta que o efeito visual atua como sincronizador sobre o comportamento ingestivo, explicando o fato dos animais tenderem a se alimentar juntos.

Outro ponto importante que devemos levar em consideração seria o consumo de água no sistema convencional, pois as aves passam a maior parte do dia ingerindo água. Este tal comportamento pode ser explicado pela falta de enriquecimento do ambiente onde se encontram as aves, ou seja, a gaiola é um ambiente que oferece poucos atrativos às aves, e um dos poucos, senão até mesmo o único neste sistema é o bico do bebedouro tipo Nipple, que muitas vezes é utilizado não para matar a sede das aves, mas como uma forma de “distração” em meio a uma condição muito propícia a ocorrência de estresse. Sob o ponto de vista do bem-estar das aves, o aumento ou diminuição deste comportamento pode estar relacionado com as condições de estresse a que o animal possa estar sendo submetido, decorrente principalmente do confinamento e da impossibilidade de execução natural dos comportamentos.

O ato de ciscar é característico e natural das aves, identificado quando a ave explora seu território com seus pés e bico. Tal comportamento foi expresso no sistema estudado, diferentemente das aves mantidas em gaiolas, pois tendem mesmo sem a presença de nenhum substrato, a apresentar o comportamento de ciscar o fundo das gaiolas. Isso ocorre, pois ciscar é um comportamento natural das aves, e a frustração deste comportamento provavelmente levará as aves a uma condição de estresse (SHIELDS et al., 2005).

Bracke e Hopster (2006) e Haas et al., (2010) verificaram que o impedimento ou diminuição do comportamento de ciscar agrava significativamente o estresse da ave, onde aparentemente há uma substituição natural deste comportamento de ciscar, para bicagem de penas, variando a intensidade de acordo com a linhagem e a idade do lote. Segundo os mesmos autores, no sistema de criação em gaiola, mesmo depois de estabelecida uma dominância e hierarquia dentro do grupo de poedeiras, as aves continuaram apresentando agressividade, indicando maior carga de estresse no sistema de criação em confinamento.

De acordo com Nicol et al., (2009) as galinhas têm preferência por ambientes onde lhes são oferecidas oportunidades de ciscar e limpar penas. Para Pereira et al. (2005) o ato de ciscar é um comportamento que carrega características complexas e amplas do bem-estar, pois, dependendo do turno o ato torna-se potencial indicador de bem-estar térmico. Já Schwean-Lardner et al., (2010) concluíram que comportamentos que denotam atividade física podem ser utilizados para se conhecer o estado sanitário e de conforto e ou bem-estar. Comportamentos que expressem atividade física são considerados em algumas situações indicadores de estresse.

O comportamento de forrageio e captura de insetos das aves é um movimento bastante vigoroso, envolvendo atividades fora do módulo de produção, como o ato de bicar os vegetais em busca de alimento, assim como predação de insetos. De acordo com Dawkins (1989) o ato de pastejo contribui para a redução de problemas, como o canibalismo. Dawkins (2003) ainda ressalta que o aumento dos níveis de bem-estar em animais que pastam está associado significativamente ao baixo índice de mortalidade.

A expressão bicagem de objetos destacou-se na área externa do galpão. O motivo que pode ter influenciado a alta incidência deste comportamento foi à possibilidade das aves explorarem seu ambiente onde estão sendo criadas. Mollenhorst et al. (2005) mencionam que galinhas mantidas em gaiolas apresentam atitude de bicar telas metálicas ou qualquer outro objeto (comedouro), comportamento este que pode refletir à falta ou frustração do acesso a substrato, assim como exploração do ambiente, forrageamento ou banho de areia.

As categorias comportamentais de estresse, investigativo, exploratório e reprodutivo apresentam-se nas Figuras 5 e 6. Compreendeu-se que as expressões comportamentais de briga (2%) e investigação de penas (52%) sobressaíram no período 2 na área interna do galpão. Porém, os mesmos comportamentos na área externa foram mais expressos no período 3, assim como a frequência de permanência no ninho (9%) (ou comportamento de choco) e bicar agressivo (2%). De modo adicional, os comportamentos reprodutivos da área interna do galpão foram frequentes no período 1 e posteriormente no período 3. Já o comportamento visitar ninhos (50%) foi saliente no período 3 em ambas as áreas observadas.

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 5 - Padrão de frequência do comportamento de estresse, investigativo, exploratório e reprodutivo observado em galinhas poedeiras na área interna do galpão

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 6 - Padrão de frequência do comportamento de estresse, reprodutivo, exploratório e investigativo observado em galinhas poedeiras na área externa do galpão

Comportamento totalmente compreendido visto que as aves iniciam um novo ciclo de postura. A formação do ovo é um processo que dura em média 25 horas e ocorre em duas etapas: na primeira etapa (4 horas) surgem todos os componentes internos do ovo; na segunda (21 horas) ocorre a deposição de cálcio para originar a casca. Do início da sua formação no ovário, onde também surge a gema, o ovo se desenvolve à medida que passa pelo oviduto, região que reúne os órgãos que constituem o aparelho reprodutor das aves, em seguida o ovo será liberado pelo corpo da galinha. No sistema de criação convencional, o comportamento de pré-postura das galinhas é bem diferente do apresentado por dois motivos: as aves não possuem ninhos e nem espaço para iniciar um comportamento exploratório como o que é executado pelas aves livres.

Duncan et al. (1978) relatam que aves criadas em gaiolas tendem a apresentar pouco ou quase nenhum comportamento de pré-postura, e quando este chega a acontecer, é quase imperceptível, pois acontece de maneira muito rápida e pouco expressiva. A maioria das linhagens criadas em sistema de gaiolas, principalmente as linhagens leves, apresentam severos sintomas de frustração durante os períodos de pré-postura provavelmente pela falta de ninho (WOOD-GUSH, 1972).

Com relação à bicagem agressiva aconteceu de forma rápida, apresentando uma frequência de apenas 2% e com pouca expressão do comportamento de agressividade, ou seja, não se verificou mais a ocorrência deste comportamento durante o período experimental entre as aves. Diferentemente de aves criadas em gaiolas, que mesmo depois de estabelecida uma dominância e uma hierarquia dentro do grupo as aves apresentam o comportamento de agressividade, provavelmente como um indicativo da maior carga de estresse sofrido pelas aves para condição de criação em confinamento (BARBOSA FILHO et al., 2007).

Para o comportamento de briga Kolb (1984) comenta que as lutas hierárquicas (bicadas fortes na crista, cabeça e nuca do adversário) acontecem desde a fase inicial como um comportamento lúdico, e Becker (2002) afirma que este vai se intensificando com a chegada da maturidade sexual, a fim de impor dominância no grupo. Importante ressaltar que apesar da ocorrência do comportamento de briga com uma frequência de 2% na presente pesquisa, este foi insignificante se comparado com aves criadas no sistema convencional.

Com relação ao comportamento das aves realizarem a investigação de suas penas ou de outras aves com o bico, existem divergências na literatura. Para Barbosa Filho et al. (2007) o comportamento de investigar ou de explorar as penas pode ser considerado como indício de desconforto, enquanto, Barehan (1976) acredita que representa sujeira no empenamento das aves, podendo levar as aves à maior necessidade de explorar suas penas. Discordando com os

autores supracitados, podemos considerar a investigação de penas como indicativo de bem-estar, pois este comportamento é característico e natural das aves. Galinhas poedeiras mantidas em gaiolas não conseguem expressar o tal comportamento devido à falta de espaço entre elas.

Nota-se nas Figuras 7 e 8 que a frequência comportamental caminhar (65%) foi igual em ambas as áreas prevalecendo no período 1. Já o comportamento voar destacou-se no período 1 com uma frequência de 19% (área interna do galpão) e no período 2 (21%) na área externa do galpão. As expressões comportamentais correr e empoleirar apresentaram uma periodicidade de 26% e 34% no período 2 (área interna) e no período 3 (área externa) de 37% e 31% respectivamente.

O ato de empoleirar é um comportamento necessário às aves, pois os benefícios deste estão diretamente ligados ao fortalecimento dos ossos das pernas por meio de exercícios físicos, no entanto corrobora para melhorar as condições de bem-estar das aves uma vez que, diminuiria a incidência de fraturas com o avanço da idade (RUDKIN; STEWART, 2003). Importante ressaltar que galinhas mantidas em gaiolas apresentam um elevado índice de problemas locomotores, como a osteopenia, desordem esquelética generalizada que afeta poedeiras adultas e pode levar a fraturas ósseas espontâneas, dor e comprometimento do bem-estar dessas aves. Esta condição ocorre caracteristicamente em algumas linhagens de poedeiras com altas taxas de produção de ovos (KOUTOULIS, 2009) e, em aves com idade superior a 40 semanas (FLEMING, 2008).

Dentre as doenças que cursam com osteopenia, a osteoporose, caracterizada pelo decréscimo progressivo na quantidade de osso estrutural mineralizado acarretando fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas. A osteoporose em poedeiras está associada à “fadiga de gaiola”, pois o confinamento das aves durante toda a sua vida produtiva contribui com a perda óssea devido à limitação à atividade física, além do prejuízo ao bem-estar animal (FLEMING, 2008).

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 7 - Padrão de frequência do comportamento de locomoção e descanso observado em galinhas poedeiras na área interna do galpão

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 8 - Padrão de frequência do comportamento de locomoção e descanso observado em galinhas poedeiras na área externa do galpão

De acordo com Tauson (2005) e Bessei (2006) aves expostas em áreas de livre movimentação afeta de forma positivamente a saúde e o bem-estar, contanto que as mesmas exprimem seus comportamentos naturais com maior frequência como o simples ato de correr, caminhar e voar. Ainda nas Figuras 7 e 8 as expressões comportamentais deitar e sentar sobressaíram-se no período 3 com frequência de 3% e 22% respectivamente em ambas as áreas, assim como o movimento de descansar (20%) e dormir (2%) no período 1 e 3. Adicionalmente o comportamento posição neutra destacou-se no período 2 com 34% de frequência.

Aves criadas em sistemas de piso ou ao ar livre adquirem uma tendência de ficarem menos tempo sentadas, deitadas ou paradas devido a uma maior disponibilidade de recursos que encontram nestes tipos de sistemas e que favorecem suas condições de bem-estar (APPLEBY et al., 1992; KEELING, 1995).

Ressalva-se que os comportamentos deitar e sentar foram expressos no presente estudo, porém em menor frequência, corroborando com o parecer dos autores. Diferentemente, aves mantidas em gaiolas passam a maior parte do tempo sentada e deitada, pois não dispõem de espaço adequado para se movimentar, muito menos recursos. O comportamento descansar e dormir são considerados uma necessidade etológica importante para as aves (PICKEL et al., 2011) visto que estes impedem possíveis alterações fisiológicas no organismo como doenças ou respostas de estresse.

A frequência das categorias comportamentais de manutenção e social encontram-se nas Figuras 9 e 10. Observou-se que os movimentos esticar pernas e asas, banho de areia, sacudir e ruflar as penas e coçar a cabeça foi evidenciado no período 3 em ambas as áreas apresentando periodicidade de 27%, 22%, 9% e 35% na devida ordem. Do mesmo modo, o comportamento banho de sol expressou frequência de 16% no período 2 e a expressão limpar o bico (10%) no período 1 nas áreas analisadas.

Sabe-se que a atividade banho de areia tem efeito comportamental e físico, visto que regula a camada lipídica das penas e mantém uma boa condição de plumagem (HOGAN; BOXEL, 1993). Segundo Nääs (1989) e Silva (2000) tal comportamento ocorre como uma forma das aves perderem calor para o ambiente, uma vez que a movimentação das penas promove uma substancial termólise por convecção, pois no período da tarde o ambiente é mais quente.

O horário tem grande influência na expressão dos comportamentos das aves devido ao comportamento biológico e principalmente ao fotoperíodo, ou seja, dependendo do fotoperíodo haverá mudanças na expressão dos comportamentos das aves. Para Appleby e

Hughes (1991) concluíram que os estímulos da luz e da temperatura ambiental podem controlar o horário de realização do banho das aves, bem como sua ocorrência ou não. O mesmo apresenta sob qualquer condição de criação sendo observado até mesmo no sistema em gaiolas, onde não há espaço e muito menos material de cama. No que tange ao bem-estar animal pode levar os animais a uma condição de frustração, causando estresse e gerando comportamentos fora dos padrões. Portanto há divergências em relação à expressão banho de areia, isto é, no estudo em questão as aves demonstraram preferência em expressar o comportamento banho de areia no período da tarde, lembrando que temperatura média registrada estava abaixo da zona de termoneutralidade.

O ato de coçar a cabeça é muito importante para as aves, pois quanto maior a intensidade, duração e incidência deste comportamento indica melhor bem-estar (BRACK; HOPSTER, 2006). Poedeiras mantidas em sistemas de gaiolas possuem privações de expressar este comportamento (FRIEND, 1991), entretanto, uma das consequências da frustração do tal comportamento corresponde bicar as penas de outras aves (HAAS et al., 2010).

O comportamento banho de sol está relacionado com a necessidade de eliminar parasitas, manter a saúde das penas e a síntese de vitamina D3 para que os ossos tenham um desenvolvimento saudável. Já o movimento sacudir e ruflar as penas remove qualquer sujeira ou poeira do corpo das aves, auxilia as penas retornar a posição normal e em alguns casos alivia a tensão (KOELKEBECK; AMOSS; CAIN, 1987), uma vez que galinhas criadas em gaiolas não conseguem expressar esses comportamentos.

A limpeza do bico, atividade expressa no presente estudo, pode ser explicada por duas razões de acordo com Choudary et al. (1972): presença de outra ave na tentativa de dizer que está se “intrometendo” no território pessoal, ou quando a ave permanecia sozinha indicava que algo de estranho estava incomodando seu bico e procurava limpar no chão ou na cama de maravalha, porém as aves no sistema convencional limpam seu bico nas telas e até mesmo no comedouro.

Como os seres humanos, as aves alongam o corpo para aliviar a tensão. Isto é especialmente importante para elas, pois passam maior parte do tempo sob suas patas. Logo, as aves esticam um pé e a asa oposta ao mesmo tempo, com o intuito de melhorar a circulação e revigorar os músculos (TOWER et al., 1967).

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 9 - Padrão de frequência do comportamento de manutenção e social observado em galinhas poedeiras na área interna do galpão

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 10 - Padrão de frequência do comportamento de manutenção e social observado em galinhas poedeiras na área externa do galpão

A frequência das expressões comportamentais referentes à bicagem não agressiva e perseguição corresponderam entre 1% e 4% destacando-se no período 1 (Figuras 9 e 10). O comportamento de interação (9%) foi maior no período 3 e a vocalização (43%) no período 1 (área interna do galpão), e os mesmos se destacaram no período 1 e 3 na área externa indicando uma frequência de 7% e 25%.

Bicagem não agressiva é caracterizada pela bicagem em outras aves. De acordo com Abrahanson (1996), a bicagem de penas é considerada um redirecionamento do comportamento de bicagem de alimentos. Durante as observações comportamentais o sistema propiciou poucas condições de expressão desse comportamento, pelo fato das aves disporem de espaço físico a ser explorado com livre acesso ao piquete.

De acordo com Grandin (1998) a vocalização é a geração ativa de sons com o uso de órgãos específicos, constituindo uma expressão do estado específico de um animal que possa ocorrer espontaneamente, ou possa ser o resultado de um evento externo. Para Kiley (1972), Fraser (1974) e Spinka (2012) vocalizações com baixas frequências (cacarejar) são utilizadas na manutenção do contato social, enquanto que as vocalizações de altas frequências (cantos, gritos, etc.) estão mais relacionadas com estados de excitação. Segundo os trabalhos de Jurgens (1979), Crowell e Comuzzi (1993), Weary e Fraser (1995) e Mulligan et. al. (2002) a vocalização pode ser uma ferramenta muito útil na avaliação do estado emocional de animais confinados ou na natureza.

Zimmerman e Koene (1998) compararam diferentes linhagens de poedeiras mantidas em gaiolas, submetidas à frustração alimentar, e concluíram que vocalizavam de formas diferentes durante exposição ao estresse, e o barulho emitido era proporcional ao sofrimento, alcançando duração superior a quatro segundos.

Os comportamentos sociais (perseguir e interagir) referem-se à interação entre indivíduos coespecíficos. Esta relação pode apresentar-se de forma cooperativa (copula, interação amigável) ou de forma conflitante (luta, disputa de território) (WILSON, 1975). Na fase juvenil, a forma mais característica de interação social é a brincadeira, ou seja, praticamente todos os mamíferos, aves e alguns répteis apresentam esta interação lúdica, dispensando um tempo e uma energia considerável nesta atividade (FAGEN, 1981; MARTIN; CARO, 1985).

Indivíduos adultos de muitas espécies também interagem de forma lúdica, tanto socialmente quanto com objetos, sendo errôneo o conceito de que a brincadeira é um comportamento exclusivo dos jovens (MANNING; DAWKINS, 1995). O comportamento social pode ser influenciado por vários fatores externos e internos. Um ambiente mais

abundante em alimento e território permite uma relação mais amigável entre os indivíduos, assim como uma hierarquia bem definida entre os animais mantém o grupo mais coeso, o que foi possível constatar claramente no presente estudo.

Cabe ressaltar que o canibalismo também foi um dos comportamentos avaliados no presente estudo, porém este comportamento não foi registrado em nenhum momento, sendo um indicativo de que as aves estavam em situação de bem-estar. MASHALY et al. (2004) relatam que poedeiras alojadas em sistemas alternativos apresentam feridas causadas por canibalismo que costumam ser encontradas principalmente no dorso, cabeça e na região da cloaca, pelo fato das aves não serem debicadas, causando mortalidade e prejudicando seriamente o bem-estar das aves. Discordando com os autores, este estudo comprovou que galinhas poedeiras podem ser criadas soltas sem causar qualquer tipo de dano às mesmas, além disso, ofereceu condições de expressarem livremente seus comportamentos naturais, diferentemente de aves mantidas em gaiolas.

Outro comportamento expresso pelas poedeiras neste trabalho foi o reflexo de tolerância ao macho (cópula), ou seja, é o estímulo da ave pelo homem realizando pressão no dorso ou mesmo caminhando entre as aves, simulando a presença de um galo (SWENSON; REECE, 1996). Este comportamento é considerado normal em animais de produção principalmente em suínos, bovinos e equinos, com a finalidade de detectar o cio nas fêmeas, demonstrando que estão aptas para ser copuladas ou inseminadas artificialmente. Estudos relatam que tal ato está relacionado com o comportamento de estresse, porém o estudo em questão não constatou estresse entre as aves.

Nas Figuras 11 e 12 apresentaram uma visão de todas as categorias comportamentais em suas respectivas áreas analisadas. Diante do exposto, podemos inferir que o estudo deste sistema revelou-se ético em comparação com o alojamento em gaiolas. Ofereceu autonomia às galinhas na possibilidade de escolher o local mais apropriado para permanecer entre as áreas exteriores e interiores do galpão, e do mesmo modo expressar seus comportamentos naturais como o simples ato de banho de areia, banho de sol, forrageamento, dentre outros.

Período 1: 08h30min às 09h30min: Período 2: 12h00min às 13h00min: Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 11 - Padrão da frequência de todas as categorias comportamentais observadas em galinhas poedeiras na área externa do galpão

Becker (2002) comenta que o comportamento pode ser utilizado como parâmetro para aferir as condições de bem-estar na qual os animais estão submetidos. Portanto, uma vez que não foram encontradas indicações de comportamentos que pudessem comprometer a integridade física e emocional das aves, bem como sua eficiência produtiva, pode-se concluir que o bem-estar das aves não foi afetado pelo sistema. Estudos realizados por Singh et al. (2016) concluíram que o peso corporal de poedeiras criadas no sistema free-range foi melhor em relação as aves mantidas somente no interior do galpão, assim como a função digestiva e motilidade intestinal.

Período 1: 08h30min às 09h30min; Período 2: 12h00min às 13h00min; Período 3: 15h30min às 16h30min

Figura 12 - Padrão de frequência dos comportamentos observado em galinhas na área externa do galpão

Rodriguez-Aurrekoetxea e Estevez (2016) observaram uma menor incidência de pododermatite e danos na plumagem em aves no sistema ao ar livre, porém Hartcher et al. (2015), assim como a presente não demonstrou nenhuma associação.

O sistema de criação em questão foi favorável para o bem-estar das galinhas poedeiras principalmente na área externa do galpão, pois evidenciou uma maior riqueza de comportamentos, ou seja, propiciou expressar uma ampla gama dos padrões de comportamentos naturais. O uso do sistema free-range tem sido associado com benefícios adicionais de bem-estar, como melhor plumagem, fraturas reduzidas de ossos da quilha e canelas, do mesmo modo menores risco de brigas e bicadas agressivas entre elas (GRANDIN,

2003). Todavia, podemos inferir também que o sistema de produção estudado pode representar uma alternativa lucrativa para pequenos produtores, além oferecer bem-estar para os animais (HEIER et al., 2002; MCINERNEY, 2004).

4.3.3 Quantificação dos níveis de corticosterona

O estresse é um dos principais parâmetros de avaliação do bem-estar animal e o cortisol tem sido utilizado como indicador biológico do estresse em muitas espécies. Observou-se na Figura 13 que houve diferença significativa ($F_{31,2}=11,87$, $P<0.001$) na quantificação de corticosterona nas áreas analisadas. Uma possível explicação para o aumento do nível de corticosterona na área externa do galpão pode ter sido o fato de que as aves estavam “livres”, ou seja, soltas no piquete e as mesmas permaneciam em estado de alerta à possíveis predadores como se estivessem em seu habitat natural, permitindo com que o nível do hormônio aumentasse consideravelmente. Mas apesar dessa diferença encontrada, os valores dos níveis de corticosterona estão inferiores quando comparados em galinhas mantidas em gaiolas, assim como a concentração basal de corticosterona mencionada na literatura.

Fraisse e Cockrem (2006) observaram níveis de corticosterona plasmáticos e fecal em duas linhagens de galinhas poedeiras White Leghorn e Hy-line Brown mantida em gaiolas. Os autores encontraram valores de 12,45 e 12,31 ng/g em amostras fecais; e 12,00 e 8,5 ng/ml no plasma. Em outro estudo realizado por Koelkebeck e Cain (1984) avaliaram concentrações de corticosterona no plasma em poedeiras criadas no sistema convencional (gaiolas), free-range e piso, e encontraram valores de 23 ng/mL; 9,5 ng/mL e 8,5 ng/mL respectivamente.

Dawkins et al. (2004) pesquisou dois grupos de poedeiras, ao longo de cinco dias os níveis de corticosterona nas excretas. Um grupo tinha acesso a uma área enriquecida com ninhos, chão coberto com cascas de arroz e uma bandeja de trigo germinado, e o outro grupo foi desprovido desses recursos. Inferiram que as concentrações de corticosterona variaram entre 25 a 30 ng/g no ambiente enriquecido, e 21 a 26,5 ng/g no segundo grupo. Gibson et al. (1986) observaram que a quantificação de corticosterona no plasma de poedeiras criadas no sistema “free-range” correspondeu 4,5 ng/mL.

Os valores encontrados no presente estudo estão próximos de Gibson et al. (1986) compreendendo entre 3,11ng/mL na área interna do galpão e 5,19 ng/mL área externa. Importante mencionar que a concentração basal de corticosterona em galinhas poedeiras é estimada entre 10 a 30 ng/mL (CULBERT; WELLS, 1975; HOLMES, 1978), já em peruas

varia entre de 42 a 118 ng/mL. No entanto podemos inferir que as concentrações de corticosterona do presente estudo estão inferiores quando comparados aos valores relatados na literatura, sendo este um indicativo de que as aves não estavam estressadas, e sim em condições de bem-estar animal. Ressalva-se que o estresse pode ocasionar impactos significativos no comportamento, nas funções imunológicas e reprodução dos animais (ALM et al., 2016). Fatores estressantes promovem a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, elevando os níveis de corticosterona na circulação sanguínea, gerando uma condição chamada de estresse (MÖSTL; PALME, 2002).

Figura 13 - Quantificação dos níveis de corticosterona nas excretas de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

O organismo animal é capaz de suportar uma determinada carga de estresse, sem que haja prejuízo às suas funções fisiológicas (BROOM; MOLENTO, 2004; GOYMANN; WINGFIELD, 2004). Quando esta capacidade de adaptação não é suficiente, o animal passa a apresentar baixas condições de bem-estar, logo se inicia um processo de desequilíbrio, com a perda da homeostase, resultando em danos muitas vezes irreparáveis ao organismo deste indivíduo (MORGAN; TROMBORG, 2007).

Porém, a avaliação fisiológica do estresse de um animal é essencial para a compreensão e aperfeiçoamento do bem-estar dos animais, assim como a saúde intestinal (LADEWIG; MATTHEWS, 1992). Vale lembrar que as concentrações plasmáticas de

glicocorticoides são amplamente utilizadas para diagnosticar respostas de estresse em várias espécies (CRAIG; CRAIG; VARGAS, 1985; VON HOLST, 1998; RETTENBACHER et al., 2004). Diante do exposto, podemos reportar que as aves apresentaram qualidade de vida no que tange o bem-estar animal, pois as condições da ambiência e a capacidade de adaptação influenciaram positivamente o comportamento das aves.

4.4 Conclusões

- Este trabalho permitiu concluir a frequência respiratória e a temperatura superficial das aves foi satisfatória;
- A resposta comportamental é a mais simples e, provavelmente, é a reação biológica mais econômica ao estresse, ou seja, a ave pode se livrar de uma situação estressante simplesmente explorando o ambiente. Se não for suficiente, ele pode apresentar outros tipos de comportamento, desde a vocalização até a expressão de comportamentos naturais;
- Os níveis de corticosterona foram menores quando comparados às galinhas mantidas no sistema convencional;
- As avaliações comportamentais, fisiológicas, ligadas à sanidade e à produção, quando associadas, constituem ferramentas eficientes no julgamento do bem-estar dos animais.

Referências

- ABD EL-HACK, M.E.; ALAGAWANY, M.; LAUDADIO, V.; DEMAURO, R. TUFARELL, V. Dietary inclusion of raw faba bean instead of soybean meal and enzyme supplementation in laying hens: Effect on performance and egg quality. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Saudi Arabia, v. 24, p. 276-285, 2017.
- ABRAHAMSSON, P. **Furnished cages and aviaries for laying hens: effects on production, health and use of facilities**. Upsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1996. 234 p.
- ALM, M.; TAUSON, R.; HOLM, L.; WICHMAN, A.; KALLIOKOSKI, O.; WALL, H. Welfare indicators in laying hens in relation to nest exclusion. **Poultry Science**, Champaign, v. 95, p.1238-1247, 2016.
- ALVES, S.P.; BARBOSA FILHO, J.A.D.; SILVA, M.A.N.; SILVA, I.J.O.; BERNARDI, J. Comparações entre comportamentos de aves poedeiras criadas no sistema de gaiolas e em cama. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 140, 2004.

_____. **Uso da zootecnia de precisão na avaliação de bem-estar climático em aves poedeiras em diferentes sistemas de criação.** 2006. 128 p. Tese (Doutorado em Física do Ambiente Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

AMARAL, A.G.; YANAGI JUNIOR, T.; LIMA, R.R.; TEIXEIRA, V.H.; SCHIASSI, L. Efeito do ambiente de produção sobre frangos de corte sexados criados em galpão comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 3, p. 649-658, 2011.

APPLEBY, M.C.; HUGHES, B.O. Welfare of laying hens in cages and alternative systems: environmental, physical and behavioral aspects. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 2, n. 47, p. 109-128, 1991.

APPLEBY, M.C.; HUGHES, B.O.; ELSON, H.A. **Poultry production systems: behavior, management and welfare.** Wallingford: CAB International, 1992. 238 p.

ARMSTRONG, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. **International Journal of Dairy Science**, Faisalabad, v. 77, p. 2044-2050, 1994.

BARBOSA FILHO, J.A.D.; SILVA, I.J.O.; SILVA, M.A.N.; SILVA, C.J.M. Avaliação dos comportamentos de aves poedeiras utilizando sequência de imagens. **Engenharia Agrícola**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 93-99, 2007.

BAREHAN, J.R. A comparison of the behavior and production of laying hens in experimental and conventional battery cages. **Applied Animal Ethology**, Amsterdam, v. 2, p. 291-303, 1976.

BECKER, B.G. Comportamento das aves e sua aplicação prática. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Tecnologia e Ciência Avícolas, 2002. p. 81-90.

BESSEI, W. Welfare of Broilers: A review. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 62, p. 455-466, 2006.

BRACKE, M.B.M.; HOPSTER, H. Assessing the importance of natural behavior for animal welfare. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, Guelph, v. 19, p. 77-89, 2006.
BROOM, D.M.; FRASER, A.F. **Domestic Animal Behaviour and Welfare.** Wallingford: CAB, 2007. 437 p.

BROOM, D.M. A history of animal welfare science. **Acta Biotheoretica**, Netherlands, v. 59, p.121-137, 2011.

BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas-revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 9, p. 1-11, 2004.

BROWN-BRANDL, T.M.; BECK, M.M.; SCHULTE, D.D.; PARKHURST, A.M.; DESHAZER, J.A. Temperature humidity index for growing tom turkeys. **Transactions of the ASAE**, United States, v. 40, n. 1, p. 203-209, 1997.

CAMERINI, N.; OLIVEIRA, D.; SILVA, R.; NASCIMENTO, J.; FURTADO, D. Efeito do Sistema de Criação e do Ambiente Sobre a Qualidade de Ovos de Poedeiras Comerciais. **Revista Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 334-339, 2013.

CANNON, W.B. Organization for physiological homeostasis. **Physiology Review**, London, v. 9, p. 399-431, 1929.

CASTILHO, V.A.R.; GARCIA, R.G.; LIMA, N.D.S.; NUNES, K.C.; CALDARA, F.R.; NÄÄS, I.A.; BARRETO, B.; JACOB, F.G. Bem-estar de galinhas poedeiras em diferentes densidades de alojamento. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, Tupã, v. 9, p. 122-131, 2015.

CHOUDARY, M.R.; ADAMS, A.W.; CRAIG, J.V. Effects of strain, age at flock assembly, and cage arrangement on behaviour and productivity in White Leghorn Type Chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 51, p. 1943-1950, 1972.

CRAIG, J.V.; CRAIG, J.A.; VARGAS, J. Corticosteroids and other indicators of hens' well-being in four laying-house environments. **Poultry Science**, Champaign, v. 65, p. 856-863, 1986.

CROWELL, D.; COMUZZIE, D. K. Baboon vocalizations as measures of psychological well-being. **Laboratory Primate Newsletter**, Providence, v. 32, p. 5-6, 1993.

CULBERT, J.; WELLS, J.W. Aspects of adrenal function in the domestic fowl. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 65, p. 363-376, 1975.

DAHLKE, F.; GONZALES, E.; GADELHA, A.C.; MAIORKA, A.; BORGES, S.A.; ROSA, P.S.; FARIA FILHO, D.E.; FURLAN, R.L. Empenamento, níveis hormonais de triiodotironina e tiroxina e temperatura corporal de frangos de corte de diferentes genótipos criados em diferentes condições de temperatura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 664-670, 2005.

DAWKINS, M.S. Time budgets in red junglefowl as a baseline for the assessment of welfare of domestic fowl. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 24, p.77-80, 1989.

_____. Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare. **Zoology**, Germany, v. 106, p. 383-387, 2003.

_____. Using behaviour to assess animal welfare. **Animal Welfare**, United Kingdom, v.13, p. 19-30, 2004.

DAWKINS, M.S.; EDMOND, A.; LORD, A.; SOLOMON, S.; BAIN, M. Time course of changes in egg-shell quality, faecal corticosteroids and behaviour as welfare measures in laying hens. **Animal Welfare**, United Kingdom, v. 13, p. 321-327, 2004.

DEL-CLARO, K. **Comportamento Animal - Uma introdução à ecologia comportamental**. Jundiaí: Livraria Conceito, 2004. 132 p.

DE PASSILLÉ, A.M.; RUSHEN, J. Can we measure human-animal interactions in on-farm animal welfare assessment? Some unresolved issues. **Applied Animal Behavior Science**, Amsterdam, v. 92, p. 193-209, 2005.

DUNCAN, I.J.H.; SAVORY, C.J.; WOOD-GUSH, D.G.M. Observations on the reproductive behaviour of domestic fowl in the wild. **Applied Animal Ethology**, Netherlands, n. 4, p. 29-42, 1978.

FAGEN, R. **Animal Play Behavior**. Champaign: Champaign University Press, 1981. 702 p.

FERRANTE, V.; VERGA, M.; MANGIAGALLI, M.G.; CARENZI, C. Behavioural reactions, semen quality and testosterone levels in cocks: genetic implications. **Animal Welfare**, United Kingdom, v. 10, n. 3, p. 269-279, 2001.

FLEMING, R.H. Nutritional factors affecting poultry bone health. **Proceedings of the Nutrition Society**, New Zealand, v. 67, p. 177-183, 2008.

FRAISSE, F.; COCKREM, J.F. Corticosterone and fear behaviour in white and brown caged laying hens. **British Poultry Science**, United Kingdom, v. 47, n. 2, p. 110-119, 2006.

FRANKEL, H.; HOLLANDS, K.G.; WEISS, H.S. Respiratory and circulatory responses of hyperthermic chickens. **Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie**, United Kingdom, v. 70, p. 55-561, 1962.

FRASER, D. The vocalization and other behaviour of growing pigs in an “open field” test. **Applied Animal Ethology**, Berlin, v. 1, n. 1, p.13-16, 1974.

FREEMAN, B.M. The domestic fowl in biomedical research: physiological effects of the environment. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, n. 44, p. 41-60, 1988.

FRIEND, T.H. Behavioral aspects of stress. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 74, n. 1, p.292-303, 1991.

GARCIA, E.R.M.; NUNES, K.C.; CRUZ, F.K. da; FERRAZ, A.L.J.; BATISTA, N.R.; BARBOSA FILHO, J.A.C. Comportamento de poedeiras criadas em diferentes densidades populacionais de alojamento. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 18, n. 2, p. 87-93, 2015.

GATES, R.S.; ZHANG, H.; COLLIVER, D.G.; OVERHULTS, D.G. Regional variation in temperature index for poultry housing. **American Society of Agricultural Engineers**, United States, v. 38, n. 1, p. 197-205, 1995.

GIBSON, S.W.; HUGHES, B.O.; HARVEY, S.; DUN, P. Plasma concentrations of corticosterone and thyroid hormones in laying fowls from different housing systems. **British Poultry Science**, United Kingdom, v. 27, p. 621-628, 1986.

GOYMANN, W.; WINGFIELD, J.C. Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. **Animal Behaviour**, United Kingdom, v. 67, p. 591-602, 2004.

GRANDIN, T. The feasibility of using vocalization scoring as an indicator of poor welfare during slaughter. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 121-8, 1998.

_____. Transferring results of behavioral research to industry to improve animal welfare on the farm, ranch and the slaughter plant. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 81, p. 215-228, 2003.

HAAS, E.N.; NIELSEN, B.L.; BUITENHUIS, A.J.; RODENBURG, T.B. Selection on feather pecking affects response to novelty and foraging behaviour in laying hens. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 124, p. 90-96, 2010.

HEIER, B.T.; HOGASEN, H.R.; JARP, J. Factors associated with mortality in Norwegian broiler flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, Netherlands v. 53, p. 147-158, 2002.

HESTER, P.Y. Impact of science and management on the welfare of egg laying strains of hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 687-696, 2005.

HILLMAN, P.E.; SCOTT, N.R.; Van THIENHOVEN, A. Vasomotion in chicken foot: dual innervation of arteriovenous anastomoses. **Animal Journal Physiology**, Netherlands, v. 242, n. 1, p. 582-590, 1982.

HOGAN, J.A.; BOXEL, F.V. Casual factors controlling dustbathing in Burmese red Junglefowl: some results and a model. **Animal Behaviour**, United Kingdom, v. 46, p. 627-635, 1993.

HUGHES, B.O.; DUNCAN, I.J.H. The notion of ethological "need", models of motivation and animal welfare. **Animal Behaviour**, United Kingdom, n. 36, p. 1696-1707, 1988.

JENDRAL, M. **Alternative layer hen housing in Europe**. Canadá: University of Alberta, 2005. 125 p.

JURGENS, U. Vocalization as an emotional indicator: a neuroethological study in the squirrel monkey. **Behaviour**, Netherlands, v. 69, p. 88-117, 1979.

HARTCHER, K.M.; TRAN, M.K.T.N.; WILKINSON, S.J.; HEMSWORTH, P.H.; THOMSON, P.C.; CRONIN, G.M. Plumage damage in free-range laying hens: Behavioural characteristics in the rearing period and the effects of environmental enrichment and beak-trimming. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 164, p. 64-72, 2015.

HOLMES, W.N. Control of adrenocortical function in birds. **Pavo**, India, v. 16, p. 105-121, 1978.

KASSIM, H.; SYKES, A.H. The respiratory responses of the fowl to hot climates. **The Journal of Experimental Biology**, United Kingdom, v. 97, n. 1, p. 301-309, 1982.

KEELING, L. Spacing behaviour and an ethological approach to assessing optimum space allocations for groups of laying hens. **Applied Animal Behavior Science**, Amsterdam, v. 44, p. 171-186, 1995.

KILEY, M. The vocalizations of ungulates, their causation and function. Z. **Tierpsychology Ethology**, Berlin, v. 31, p.171-222, 1972.

KOELKEBECK, K.W.; CAIN, J.R. Performance, behavior, plasma corticosterone, and economic returns of laying hens in several management alternatives. **Poultry Science**, Champaign, v. 63, n. 11, p. 2123-31, 1984.

KOELKEBECK, K.W.; AMOSS, M.S.; CAIN, J.R. Production, physiological, and behavioral responses of laying hens in different management environments. **Poultry Science**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 397-407, 1987.

KOLB, E. **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1984. 612 p.

KOUTOULIS, K.C. Osteopenia: a disease of laying hens with major impact on production and welfare (In Greek). **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, Moskva, v. 60, p. 51-62, 2009.

LADEWIG, J.; MATTHEWS L.R. The importance of physiological measurements in farm animal stress research. In: 52th ANNUAL CONFERENCE NEW ZEALAND SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, 1992, Canterbury. **Proceedings...** Canterbury: SNA, 1992. p. 77-79.

LINSLEY, J.G.; BURGER, R.E. Respiratory and cardiovascular responses in the hyperthermic domestic cock. **Poultry Science**, Champaign, v. 43, n. 2, p. 291-305, 1964.

LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, United Kingdom, v. 30, p. 1017-1021, 2005.

MANNING, A.; DAWKINS, M.S. **An introduction to animal behaviour**. Cambridge: University Press, 1995. 450 p.

MARTIN, P.; CARO, T.M. On the functions of play and its role in behavioral developmental. **Advances in the Study of Behavior**, United States, v. 15, p. 59-103, 1985.

MASHALY, M.M.; HENDRICKS, G.L.; KALAMA, M.A. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 889-894, 2004.

McINERNEY, J.P. Animal welfare, economics and policy – report on a study undertaken for the Farm & Animal Health Economics Division of Defra, 2004. Disponível em: <<http://www.defra.gov.uk/esg/reports/animalwelfare.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

MCKENZIE, S.; DEANE, E.M. Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, United States, v. 140, p. 81-87, 2005.

MENCH, J.A. Applied ethology and poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, p. 631-633, 1992.

MOLLENHORST, H.; RODENBURG, T.B.; BROKKERS, E.A.M.; KOENE, P.; BOER, I.J.M. On-farm assessment of laying hen welfare: A comparison of one environment – Based and two animal-based methods. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 90, p. 277-291, 2005.

MORGAN, K.N.; TROMBORG, C.T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 102, p. 262-302, 2007.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, United States, v. 23, p. 67-74, 2002.

MULLIGAN, B.E.; BAKER, S.C.; MURPHY, M.R. Vocalizations as indicators of emotional stress and psychological well being in animals. **Animal Welfare Informative**, United States, v. 5, p. 3-4, 2002.

NÄÄS, I.A. **Princípios do conforto térmico na produção animal**. São Paulo: Ícone, 1989. 183 p.

NÄÄS, I.A. ROMANINI, C.E.B.; NEVES, D.P.; NASCIMENTO, G.R.; VERCELLINO, R. A. Broiler surface temperature distribution of 42 day old chickens. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 5, p. 497-502, 2010.

NICOL, C.J.; CAPLEN, G.; EDGAR, J.; BROWNE, W.J. Associations between welfare indicators and environmental choice in laying hens. **Animal Behaviour**, United Kingdom, v. 78, p. 413-424, 2009.

OLIVEIRA NETO, A.R.; OLIVEIRA, R.F.M.; DONZELE, J.L.; ROSTAGNO, H.S.; FERREIRA, R.A.; MAXIMIANO, H.C.; GASPARINO, E. Efeito da temperatura ambiente sobre o desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dieta controlada e dois níveis de energia metabolizável. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 183-190, 2000.

PEREIRA, D.F.; NÄÄS, I.A.; ROMANINI, C.E.B.; SALGADO, D.D.; PEREIRA, G.O.T. Broiler breeder behavior and egg production as function of environmental temperature. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, p. 9-16, 2007.

PICKEL, T.; SCHOLZ, B.; SCHRADER, L. Roosting behaviour in laying hens on perches of different temperatures: trade-offs between thermoregulation, energy budget, vigilance and resting. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 134, p. 164-169, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2007. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 17 set. 2016.

RETTENBACHER, S.; MOSTL, E.; HACKL, R.; GHAREEB, K.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. **British Poultry Science**, United Kingdom v. 45, n. 5, p. 704-711, 2004.

RICHARDS, S.A. The significance of changes in the temperature of the skin and body core of the chicken in the regulation of heat loss. **Journal of Physiology**, Cambridge, v. 216, p. 1-10, 1971.

RODRIGUES, V.C. **Distribuição espacial e bem-estar de aves poedeiras em condições de estresse térmico utilizando visão computacional e inteligência artificial**. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Física do Ambiente Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RODRIGUEZ-AURREKOETXEA, A.; ESTEVEZ, I. Use of space and its impact on the welfare of laying hens in a commercial free-range system. **Poultry Science**, Champaign, v. 95, p. 2503-2513, 2016.

RUDKIN, C.; STEWART, G.D. Behavior of hens in cages - A pilot study using video tapes. **A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation**, United States, v. 40, p. 102, 2003.

SANTOS, M.J.B. **Sistema de produção de frangos de corte caipira com piquetes enriquecidos e sua influência no bem-estar animal e desempenho zootécnico**. 2009. 96 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

SCHWEAN-LARDNER, K.; FANCHER, B.I.; CLASSEN H.L. Effect of daylength on physiological and behavioral rhythms in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, p. 521-529, 2010.

SHEVEL'KO, E.A. Thermoregulation in chickens under the effects of controlled temperature doses. **Biulleten' eksperimental'noï biologii i meditsiny**, Moskva, v. 64, n. 9, p. 29-32, 1967.

SHIELDS, S.J.; GARNER, J.P.; MENCH, J.A. Effect of sand and wood-shavings bedding on the behavior of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n.12, p.1816-24, 2005.

SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000. 286 p.

SILVA, M.A.N.; SILVA, I.J.O.; PIEDADE, S.M.S.; MATIINS, E.; COELHO, A.A.D.; SAVINO, V.J.M. Resistência ao estresse calórico em frangos de corte de pescoço pelado. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 27-33, 2001.

SILVA, I.J.O.; FILHO, J.A.D.B.; SILVA, M.A.N.; PIEDADE, S.M.S. Influência do sistema de criação nos parâmetros comportamentais de duas linhagens de poedeiras submetidas a duas condições ambientais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1439-1446, 2006.

SINGH, M.; RUHNKE, I.; KONING, C.T.; DRAKE, K.; SKERMAN, A. Nutrient loading on free range layer farms. In: 27th ANNUAL AUSTRALIAN POULTRY SCIENCE SYMPOSIUM, 2016, Sydney. **Anais...** Sydney: APS, 2016. p. 29-30.

SPINKA, M. Social dimension of emotions and its implication for animal welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 138, n. 2, p. 170-181, 2012.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 740 p.

TAUSON, R. Management and housing systems for layers – effects on welfare and production. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 61, p. 477-490, 2005.

TAYLOR, P.E.; NANCY, C.A.; COERSE, M.H. The effects of operant control over food and light on the behavior of domestic hens. **Applied Animal Behavior Science**, Amsterdam, v. 71, p. 319-333, 2001.

TEETER, R.G. Optimizing production of heat stressed broilers. **Poultry Digest**, United States, v. 53, n. 5, p.10-27, 1994.

TOWER, B.A.; OLINDE, A.J.; BAKER, F.R.; ROY, E.P. Performance of layers confined in single versus colony cages. **Poultry Science**, Champaign, v. 46, p. 1330-1337, 1967.

VON HOLST, D. The Concept of Stress and Its Relevance for Animal Behavior. **Advances in the Study of Behavior**, United States, v. 27, p. 123-131, 1998.

WEARY, D.M.; FRASER, D. Calling by domestic piglets: reliable signals of need? **Animal Behaviour**, United Kingdom, v. 50, p. 1047-1055, 1995.

WILSON, E.O. **Sociobiology: the new synthesis**. Massachussets: University Press, 1975. 366 p.

WOOD-GUSH, D.G.M. Strain differences in response to sub-optimal stimuli in the fowl. **Animal Behaviour**, United Kingdom, v. 20, n. 1, p. 72-76, 1972.

ZIMMERMAN, P.H.; KOENE, P. The effect of frustrative nonreward on vocalisations and behaviour in the laying hen, *Gallus gallus domesticus*. **Behavior Processes**, Netherlands, v. 44, p. 73-79, 1998.

5 DINÂMICA POPULACIONAL DE SIMBIONTES INTESTINAIS EM GALINHAS POEDEIRAS NO SISTEMA FREE-RANGE LIVRE DE ANTIBIÓTICOS

Resumo

O sistema free-range ou “ao ar livre” sem o uso de antibióticos surge como uma alternativa aos sistemas confinados de galinhas poedeiras. A melhor compreensão do ecossistema microbiano do intestino das aves pode levar a melhorias na produtividade, saúde, bem-estar, redução de patógenos e do impacto ambiental da produção avícola para uma indústria mais sustentável. O objetivo deste estudo foi avaliar a microbiota intestinal de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range sem o uso de antibióticos, acessando a densidade de grupos bacterianos benéficos ou nocivos a esses animais através do número de cópias dos genes 16S rRNA para cada grupo bacteriano alvo, por meio da análise de qPCR. A pesquisa foi conduzida em um galpão comercial da empresa Korin Agropecuária. Galinhas poedeiras da linhagem Lohmann Brown foram avaliadas no período compreendido entre 13^a, 24^a e 63^a semanas de idade, ou seja, pré-pico de postura, pico e pós-pico de postura, respectivamente. As análises revelaram diferentes padrões de densidade dos simbiontes em relação às regiões estudadas. Constatou-se maior densidade bacteriana no segmento ceco, subsequente o íleo, jejuno e duodeno. A população das bactérias benéficas foi significativamente maior em comparação as bactérias patogênicas. A densidade do simbionte *Bacteroides* foi maior no ceco, seguido de *Fusobacterium*, e dentre as bactérias patogênicas *Campylobacter* apresentou maior densidade, mas inferior à *Bacteroides*. *Lactobacillus* e *Bacteroides* se destacaram nas demais regiões avaliadas. Os simbiontes intestinais estudados demonstraram crescimento diferencial ao longo do período estudo. As tendências de crescimento bacteriano ao longo do desenvolvimento e a relevância desse fenótipo para o equilíbrio da microbiota são discutidas.

Palavras-chave: Bem-estar animal; Galinhas poedeiras; Microbiota intestinal

Abstract

The free-range system for egg production consists of keeping laying hens in natural conditions, with freedom of movement. Free-range system appears as an alternative to confined systems of laying hens. A better understanding of the bird gut microbial ecosystem may lead to improvements on poultry productivity, health, welfare, and the increasing poultry industry sustainability by reducing environmental impact. In here, we aimed to evaluate gut microbiota of the laying hens reared with no antibiotics under free-range system conditions by estimating the density of selected target-bacterial groups commonly reported as beneficial or harmful to poultry. Densities of the target microbes were assessed by absolute quantitative PCR analysis of the 16S rRNA genes number of copies for each target-group. Sampling of feces and gut were carried out by using Lohmann Brown hens kept in industrial-scaled sheds and in normal rearing conditions. Birds were evaluated during their egg laying production period, corresponding to the early egg laying age (13th week), high egg laying age (24th week), and late egg laying age (63th week). Data analyses demonstrated different density patterns between gut symbionts and gut regions studied. Bacterial density showed an increasing growth trend across gut regions, but higher densities were detected in the ceca. Densities of the beneficial bacteria were significantly higher than those demonstrated by pathogenic group. The beneficial gut symbiont *Bacteroides* was predominant in the cecum, but among the pathogenic *Campylobacter* was the highlighted group. The bacterial growth

trends throughout development, their interactions and its implications for the microbiota balance itself and to hens welfare are discussed.

Keywords: Animal welfare; Intestinal microbiota; Laying hens

5.1 Introdução

A saúde intestinal é o fator chave para maximizar saúde, desempenho, e bem-estar na produção avícola (JEURISSEN et al., 2002; YEGANI; KORVER, 2008). A microbiota intestinal constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, atuando diretamente na secreção de peptídeos antimicrobianos e influenciando a regulação do metabolismo do epitélio intestinal (LAPARRA; SANZ, 2010). Dessa forma, o equilíbrio da microbiota intestinal confere inúmeros benefícios ao hospedeiro, por meio do estímulo à produção de vitaminas, modulação imunológica e inibição de patógenos.

Por outro lado, o desequilíbrio da comunidade microbiana pode contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas e imunológicas (JEURISSEN et al., 2002). Sob condições estressantes, cepas de microrganismos potencialmente patogênicas e naturalmente presentes na comunidade microbiana, podem obter vantagens adaptativas, desenvolvendo-se em função de condições favoráveis decorrentes do desequilíbrio instaurado, condição denominada disbiose. A ocorrência de infecções está comumente associada ao estado de disbiose, pois o controle natural exercido pelos microrganismos benéficos, normalmente predominantes, fica prejudicado (MARCH, 1979; MILES, 1993).

O desequilíbrio da microbiota intestinal está associado ao estresse ou a eventos associados à estratégia de manejo dos animais (OAKLEY et al., 2014). Desse modo, a ocorrência de fatores como estresse térmico, mudança brusca de ambiente, alterações hormonais e comportamentais, retirada de alimentos e uso de antibióticos, podem levar a alterações morfofisiológicas do organismo hospedeiro, como por exemplo, a degeneração da camada mucosa que reveste o epitélio intestinal. Nessas condições, ocorre a eliminação de microrganismos benéficos associados o que afeta qualitativa e quantitativamente a comunidade microbiana com consequências negativas para a saúde e a produtividade do animal (TANNOCK; SAVAGE, 1974; SODERHOLM et al., 2002, ABEYESINGHE et al., 2001, ZOETENDAL et al., 2004, HUMPHREY, 2006; KORVER, 2006).

Desse modo, a estratégia de utilização de antibióticos e quimioterápicos na alimentação animal devem seguir processos racionais a fim de minimizar efeitos negativos

sobre a microbiota e em última instância ao animal e sua produtividade (CROMWELL, 1991; LIN et al., 2013). Nos sistemas de produção convencional a utilização muitas vezes indiscriminada de antibióticos tem gerado preocupação do mercado consumidor (COX, 2016).

O uso constante de antibióticos na alimentação animal passou a ser visto como fator de risco para a saúde humana, passando a ser visto com preocupação pelo mercado consumidor devido ao a) risco de indução da resistência cruzada em bactérias patogênicas para humanos; e a b) presença potencial de resíduos na carne, ovos ou leite voltados à alimentação humana.

Tais resíduos seriam representados pelos próprios aditivos empregados na ração animal ou por metabólitos secundários que podem se acumular nos alimentos, promovendo riscos variados à saúde do consumidor que vão desde reações de hipersensibilidade a propriedades cancerígenas (GUNALL et al., 2006; TOROK et al., 2011; D’COSTA, 2011; MODI; COLLINS; RELMAN, 2014). Adicionalmente, a utilização indiscriminada de antibióticos leva a seleção de linhagens resistentes de bactérias patogênicas ao homem (MENTEN, 2001; ANDERSSON; HUGHES, 2010; FINLEY et al., 2013).

Desse modo, cada vez mais os sistemas produtivos devem buscar atender não somente aos dispositivos legais pertinentes a questão de bem-estar animais, mas também à crescente demanda do mercado consumidor por sistemas de produção livre de antibióticos (ALLEN et al., 2013). Nesse contexto, o sistema free-range ou “ao ar livre” sem o uso de antibióticos surge como uma alternativa aos sistemas confinados (DEMATTE FILHO, 2014). Assim, espera-se que esse sistema torne-se cada vez mais difundido em atenção à demanda do mercado consumidor, regulamentações ambientais e de bem-estar animal (KNIEREM, 2006).

No sistema free-range as aves são criadas livres e em contato direto com o solo, promovendo benefícios diretos e indiretos sobre o bem-estar dos animais por permitir ao animal mostrar padrões de comportamentos naturais como ciscar, voar, forragear, etc. (COOPER; ALBENTOSA, 2003). Outro diferencial nesse sistema de criação é que as aves poedeiras não recebem antibióticos ou quimioterápicos, assegurando maior qualidade aos consumidores e isenção de resíduos nos ovos.

Assim, o presente estudo tem o objetivo avaliar a microbiota intestinal de galinhas poedeiras da linhagem Lohmann Brown mantidas no sistema free-range sem o uso de antibióticos, acessando a densidade de grupos bacterianos benéficos ou nocivos a esses animais através do número de cópias dos genes 16S rRNA para cada grupo bacteriano-alvo, representados por *Lactobacillus* spp. (Firmicutes), *Bacteroides* spp. (Bacteroidetes), *Bifidobacterium* spp. (Actinobacteria), *Fusobacterium* spp. (Fusobacteria), *Salmonella* spp. (γ -Proteobacteria), *Clostridium* spp. (Firmicutes), *Campylobacter* spp. (ϵ -Proteobacteria) e

Escherichia coli (γ -Proteobacteria) (GEDEK, 1989, APAJALAHTI; KETTUNEN; GRAHAM, 2004). Ademais, tal metodologia adotada nesta pesquisa, consiste em uma nova ferramenta para mensurar o bem-estar das aves. Os simbioses intestinais estudados demonstraram crescimento diferencial ao longo do período testado. As tendências de crescimento bacteriano ao longo do desenvolvimento e a relevância desse fenótipo para o equilíbrio da microbiota são discutidas.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Coleta das amostras

Galinhas poedeiras da linhagem Lohmann Brown criadas no sistema free-range livre de antibióticos foram amostradas aleatoriamente para a realização de coletas de partes do trato intestinal durante as fases de pré-postura (13^a semana de idade), pico de postura (24^a semana de idade) e pós-postura (63^a semana de idade) durante o período experimental.

Foram coletadas amostras de 3 animais em triplicata biológica por tratamento, totalizando 9 animais por período amostrado. As aves foram sacrificadas sem jejum prévio por deslocamento cervical. Na sequência realizou-se uma incisão ventral para abertura da cavidade abdominal e remoção do trato intestinal. Imediatamente após a remoção do trato intestinal, foram coletados os fragmentos correspondentes à porção medial de cada região amostrada. Assim, foram coletadas as regiões medianas do duodeno, jejuno, íleo (intestino delgado), e ceco (intestino grosso) (Figura 1). Os segmentos coletados foram imediatamente acondicionados em tubos de polipropileno tipo *Falcon* (BD Biosciences[®]) e armazenados em ultrafreezer a -80°C até a extração do DNA genômico (gDNA).

Figura 1 - Dissecção do trato intestinal de galinhas poedeiras (A-B) mantidas no sistema free-range livre de antibióticos. O intestino completo (C) foi disposto de modo a facilitar a identificação e coleta das seções correspondentes ao duodeno (d), jejuno (j), íleo (i) e cecos (c)

5.2.2 Preparo das amostras e extração de DNA genômico

As amostras foram processadas seguindo metodologia descrita por Gong et al. (2002). Em resumo, três porções de 5 cm da região mediana de cada segmento intestinal amostrado foi aberta longitudinalmente, ainda congeladas, em placa de petri estéril e misturadas formando um pool que correspondeu a uma repetição biológica (i.e. três animais = uma repetição biológica). Em seguida, o pool de fragmentos intestinais previamente separados foi lavado no interior de tubo de polipropileno tipo Falcon contendo 15 mL de tampão fosfato salino adicionado de 1% (v/v) Tween80 (CSH PROTOCOLS, 2006).

Então, as amostras foram agitadas no vortex por 5 min e os segmentos intestinais de cada pool foram descartados. A solução remanescente foi centrifugada a 22.000 g à 4°C por 15 min para o descarte do sobrenadante. Os pellets obtidos foram resuspendidos em solução TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) e centrifugados a 30.000 g à 4°C por 10 min

para o descarte do sobrenadante. Os pellets bacterianos resultantes foram armazenados a -80°C até a extração do DNA genômico (gDNA).

O gDNA foi extraído com a utilização do kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit® (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. O gDNA extraído foi mantido a -20°C até as análises subsequentes de reação em cadeia da polimerase (PCR).

5.2.3 Quantificação do DNA genômico

O DNA genômico (gDNA) obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific) e a qualidade foi determinada a partir dos valores obtidos para as razões 260/280 e 260/230 e análise em gel de agarose a 0,8% (w/v) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio em solução tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1x (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 7,2) em voltagem constante de 110 V. As amostras com qualidade comprovada foram utilizadas nas reações de PCR subsequentes, utilizando-se de iniciadores grupo-específicos (item 2.4, Tabela 1).

A partir da quantificação do gDNA total extraído para cada triplicata, foram calculados os valores de gDNA bacteriano por indivíduo-equivalente (ng/ave-Δeq), isto é, foi estimado a concentração de gDNA obtido para seção intestinal de interesse por ave-equivalente. Dessa forma, as determinações do número de cópias a partir do gDNA utilizado nas reações quantitativas de PCR em tempo real (qPCR) de cada grupo bacteriano foram expressas de modo a representar um indivíduo (ave).

5.2.4 Iniciadores específicos utilizados

Para a realização do ensaio de qPCR foram selecionados iniciadores específicos publicados, para cada grupo bacteriano de interesse (Tabela 1). Após a seleção foram verificados os parâmetros de qualidade dos iniciadores (dimerização, hairpin, temperatura de desnaturação) no aplicativo online OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), antes do envio das sequências para síntese.

Tabela 1 - Primers utilizados na reação de qPCR

Grupo Alvo	Ampl. (pb) ¹	Anelamento (°C) ²	Sequência (5'3')	Referência
Universal (Eubacteria)	180	56	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT R: TATTACCGCGGCTGCTGGC	Clifford et al. (2012)
<i>Lactobacillus</i> spp.	341	58	F: CACCGCTACACATGGAG R: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	Heilig et al. (2002)
<i>Bacteroides</i> spp.	106	60	F: GAGAGGAAGGTCCCCCAC R: CGCTACTTGGCTGGTTCAG	Layton et al. (2006)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	244	60	F: CGCGTCYGGTGTGAAAG R: CCCCACATCCAGCATCCA	Vignæs et al. (2011)
<i>Fusobacterium</i> spp.	253	51	F: KGGGCTCAACMCMGTATTGCGT R: TCGCGTTAGCTTGGGCGCTG	Suchodolsk et al. (2012)
<i>Salmonella</i> spp.	107	60	F: ACGACTGGGATATGAACGGGGAA R: TCGTTGTACTTGATGCTGCGGAG	Hassena et al. (2015)
<i>Clostridium</i> spp.	112	60	F: CTGCAGATAGCTTAGGAAATATTGATCA R: GCAGCTAAATCAAGGATTTCTTTTCT	Fukushima et al. (2007)
<i>Campylobacter</i> spp.	108	60	F: CACGTGTCACAATGGCATAT R: GGCTTCATGCTCTCGAGTT	Leblanc-Maridor et al. (2011)
<i>Escherichia coli</i>	85	54	F: ACCAATGATATTGCGGTGAT R: CTGCGTTCTGTTGCGGCT	Colomer-Lluch et al. (2011)

¹Ampl: tamanho do amplicon em pares de bases.²Anelamento: temperatura de anelamento dos oligos para qPCR.

5.2.5 Clonagem e otimização das condições de reações de PCR quantitativo

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador convencional para a obtenção dos produtos de amplificação de cada conjunto de iniciadores específicos nas seguintes condições: 95°C por 2 min (1 ciclo); 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 2 min (35 ciclos), seguidos de extensão final a 60°C por 5 min. Os fragmentos amplificados por cada conjunto de iniciadores foram purificados pelo método ExoSAP-IT™ (ThermoFisher Scientific) antecedendo ao processo de inserção em plasmídeo-vetor disponível no sistema pGEM®-T Easy Vector System (Promega), conforme recomendações do fabricante.

Os plasmídeos contendo o inserto de interesse foram utilizados na transformação de células competentes de alta eficiência OneShot® TOP10 (ThermoFisher Scientific) para a multiplicação dos plasmídeos, seguindo as recomendações do fabricante. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura Luria Bertani (LB) (CSH PROTOCOLS, 2006) contendo 100 µg/mL de ampicilina, e 20 ng/µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-GAL) como substrato indicativo de transformação. Colônias positivas foram isoladas, cultivadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e utilizadas para a extração dos plasmídeos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A qualidade dos plasmídeos extraídos foi confirmada por meio da amplificação de seus insertos, utilizando-se de iniciadores específicos para cada gene de interesse, em termociclador programado a 95°C por 5 min (1 ciclo); 95°C por 45 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s (40 ciclos); seguidos de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram resolvidos via eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL brometo de etídio, em tampão 1X Tris-acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 7,2) a voltagem constante de 110 V, seguido de análise em transiluminador UV. Para a confirmação da seleção de plasmídeos contendo insertos do tamanho desejado foi utilizado o marcador 1Kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific). Alternativamente, os plasmídeos foram linearizados com a utilização de enzima de restrição Sac I (Promega), que promove a clivagem do plasmídeo em apenas um sítio de restrição, para a confirmação do tamanho correspondente (plasmídeo + inserto) por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, em condições de corrida idênticas às condições citadas anteriormente. Os plasmídeos de especificidade e qualidade confirmados foram utilizados para a geração das curvas padrão de diluição.

Para a geração da curva padrão de diluição seriada foram conduzidas reações com uma série de seis diluições do plasmídeo+inserto contendo de 30 ng/μL a 9,6 pg/μL em duplicata, em condições de reação otimizadas para cada conjunto de iniciadores. As reações de qPCR foram realizadas no equipamento ViiA 7 (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Clostridium* e *Campylobacter* [50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 45 ciclos a 95°C por 15s e 60°C por 30s, seguidos de curva de Melting para confirmar a especificidade da reação, 95°C por 15s, 60°C por 1 min e 95°C por 15s]; *Lactobacillus* [50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 45 ciclos a 95°C por 15s e 58°C por 30s, e curva de Melting 95°C por 15s, 58°C por 1 min e 95°C por 15s]; *Fusobacterium* [50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 45 ciclos a 95°C por 15s e 51°C por 30s, e curva de Melting 95°C por 15s, 51°C por 1 min e 95°C por 15s]; *Escherichia coli* [50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 45 ciclos a 95°C por 15s e 54°C por 30s, e curva de Melting 95°C por 15s, 54°C por 1 min e 95°C por 15s]; iniciador Universal [50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 45 ciclos a 95°C por 15s e 56°C por 30s, seguidos e curva de Melting 95°C por 15s, 56°C por 1 min e 95°C por 15s].

O número de cópias ou moléculas/μL foi determinado a partir da Equação (1) descrita por Whelan et al. (2003) para a determinação estimada do número de bactérias-alvo:

$$N = \frac{X \text{ g}/\mu\text{L DNA}}{\text{Tamanho do clone em pb} \times 660} 6,022 \times 10^{23} \quad (1)$$

Sendo,

X = quantidade de DNA em g/μL

Clone = plasmídeo + inserto

660 g/mol = peso molecular médio de 1 pb DNA

$6,023 \times 10^{23}$ = número de moléculas em 1 mol (Nº de Avogadro)

A quantificação da densidade dos simbiosites foi obtida por comparação com a curva padrão no sistema de qPCR ViiA7. As reações foram conduzidas contendo 10 μL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) buffer (ThermoFisher Scientific), 2 μL do conjunto de iniciadores (concentração de 10 μM), 2 μL de DNA genômico da amostra e 6 μL de água (nuclease-free), totalizando 20 μL de volume final. As reações foram conduzidas em três repetições biológicas em duplicata técnica para cada segmento avaliado, e o número de cópias foi determinado através das médias.

5.2.6 Análises estatísticas

5.2.6.1 Análise descritiva

Para a análise descritiva utilizou-se estatísticas básicas como média, desvio padrão em relação à média. Ademais, foram elaborados gráficos para a descrição do estudo envolvendo as bactérias benéficas e patogênicas.

5.2.6.2 Modelagem estatística

As abordagens utilizadas neste trabalho se inserem nos métodos para a análise de medidas repetidas. No entanto, devido às restrições experimentais, foram feitas duas análises independentes. A primeira foi baseada na teoria dos modelos mistos para análise intragrupos (bactérias benéficas ou patogênicas) e a subsequente foi centrada na teoria das equações de estimação generalizadas para análise intergrupos. Ambas as metodologias são extensões dos modelos lineares generalizados (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Esses modelos permitem a análise de dados provenientes de diversas distribuições, sejam elas discretas ou contínuas.

Para a análise dos dados a escala original dos mesmos foi alterada dividindo os valores observados da densidade por 10^6 . Além disso, todas as análises apresentadas foram desenvolvidas utilizando o ambiente computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

5.2.6.3 Análise intragrupos via modelos lineares generalizados mistos

Coincide y_{ijk} a realização de uma variável aleatória Y_{ijk} , a qual representa a densidade da ocorrência de bactérias avaliada na espécie i , $i = 1, 2, \dots, I$, no seguimento j , $j = 1, 2, \dots, J$ e no tempo t_k , $k = 1, 2, \dots, K$. Trata-se, portanto, de uma avaliação longitudinal, isto é, com medidas repetidas no tempo. Nesse caso, Verbeke e Molenberghs (2000) sugerem a utilização de modelos de regressão com adição de efeitos aleatórios no preditor linear.

Ocorre, entretanto, que a variável aleatória Y_{ijk} não tem distribuição normal, apresentando uma forte assimetria positiva. Dessa forma, segundo Agresti (2015) uma distribuição alternativa para respostas assimétricas não negativas é a distribuição gamma. Geralmente essa distribuição é apresentada em termos de dois parâmetros, um parâmetro de forma μ_{ijk} e um de escala ϕ . Aqui se tem um parâmetro de forma diferente para respostas

medidas na i -ésima espécie, encontrada no j -ésimo segmento no tempo t_k . Assim, a função densidade de probabilidade é dada por:

$$f(y_{ijk}; \mu_{ijk}, \emptyset) = \frac{1}{\Gamma(\emptyset-1)} \left(\frac{1}{\mu_{ijk}\emptyset} \right)^{\frac{1}{\emptyset}} y_{ijk}^{\frac{1}{\emptyset}-1} \exp \left(-\frac{y}{\mu_{ijk}\emptyset} \right) \text{ para } y_{ijk} > 0 \quad (2)$$

onde Γ é a função gamma. Adicionalmente, neste caso o efeito de espécie pode ser tratado como aleatório porque é uma amostra representativa das possíveis espécies bacterianas encontradas no j -ésimo segmento do intestino dos frangos. Assim, a abordagem dos modelos lineares generalizados mistos pode ser utilizada. Neste contexto, para a construção do modelo assume-se que o logaritmo da densidade, $\log(Y_{ijk})$, segue uma distribuição gamma, tal que

$$\begin{cases} \log(Y_{ijk}) \mid b_i \sim \text{Gamma}(\mu_{ijk}, \emptyset), \\ b_i \sim N(0, \sigma_b^2), \\ \eta_{ijk} = \frac{1}{\mu_{ijk}} = (\beta_0 + b_i) + \beta_{1j}\text{segmento}_j + \beta_{2k}\text{tempo}_k + \gamma_{jk}\text{segmento:tempo}_{jk} \end{cases} \quad (3)$$

em que β_0 é a média geral, β_{1j} ; β_{2k} ; γ_{jk} são os parâmetros associados aos efeitos de segmento, tempo e interação entre segmento e tempo, respectivamente, considerados como fixos no modelo; b_i é a variável aleatória inerente ao efeito de espécie, para a qual supõe-se distribuição normal, com média zero e variância σ_b^2 .

Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas entre os grupos de segmentos dentro de um determinado tempo, ou seja, foram testadas as seguintes hipóteses $H_0: \mu_{jk} - \mu_{j'k} = 0$ contra $H_1: \mu_{jk} - \mu_{j'k} \neq 0$ considerando um nível de 0,05 de probabilidade, em que $j \neq j' = 1, 2, \dots, J$. Além disso, foi utilizada a correção de Bonferroni para controlar a probabilidade de uma hipótese nula (H_0) verdadeira ser incorretamente rejeitada, ou seja, dada todas as hipóteses nulas verdadeiras, a probabilidade de se cometer o erro tipo I não ultrapassa o nível $\alpha = 0,05$ (ARMSTRONG, 2014).

5.2.6.4 Análise intergrupos via Equações de Estimação Generalizadas (EEG)

Para a análise comparativa entre os grupos de bactérias patogênicas e benéficas, foi utilizada a metodologia dos modelos lineares generalizados para medidas repetidas no tempo, via Equações de Estimação Generalizadas (LIANG; ZEGGER, 1986). Este método permite o ajuste de um modelo e, em paralelo, parâmetros de correlação, necessários (mas não de interesse prático) associados às observações repetidas em cada unidade experimental. Para tanto foi usado o logaritmo da densidade, aproximando-o da distribuição Gamma. O modelo assumido foi:

$$\log(Y_{ijk}) \sim \text{Gamma}(\mu_{ijk}, \phi) \quad (4)$$

com o preditor linear:

$$\eta_{ijk} = \frac{1}{\mu_{ijk}} = \beta_0 + \beta_{1i} \text{tipo}_i + \beta_{2j} \text{segmento}_j + \beta_{3k} \text{tempo}_k + \gamma_{ij} (\text{tipo} \times \text{segmento})_{ij}, \quad (5)$$

para o qual usou-se uma estrutura de correlação permutável, que apresenta menor número de parâmetros, tendo em vista a estrutura do modelo e limitação dos dados.

$$R(\alpha) = \begin{bmatrix} 1 & \alpha & \alpha \\ \alpha & 1 & \alpha \\ \alpha & \alpha & 1 \end{bmatrix} \quad (6)$$

A análise dos fatores do modelo foi feita pela análise de desvios, uma generalização da análise da variância para modelos desta classe. A análise foi desdobrada para permitir a comparação entre os segmentos.

5.3 Resultados e Discussão

Os simbioses intestinais avaliados nesse estudo apresentaram tendência de crescimento positivo em todas as regiões do intestino e ao longo dos períodos de

desenvolvimento das aves poedeiras (Figuras 2 e 3). Essa tendência de crescimento apresentou diferenças significativas entre os grupos de bactérias benéficas e patogênicas (Tabela 2). E, em geral, as maiores densidades bacterianas foram detectadas nas regiões anaeróbicas do intestino anterior (íleo) e posterior (cecos).

Os padrões observados foram condizentes ao perfil metabólico dos simbiontes estudados, isto é, simbiontes de metabolismo anaeróbico predominaram nas regiões intestinais condizentes (LU et al., 2003). Os gêneros *Bacteroides* e *Campylobacter* foram predominantes no intestino posterior (ceco) (Tabela 2). Essa tendência foi seguida pelos simbiontes dos grupos *Fusobacterium* e *Salmonella* os quais apresentaram densidade numericamente inferior a *Bacteroides* e *Campylobacter*, porém superiores a *Lactobacillus* e *Escherichia coli* (Tabela 2). Ainda no ceco, *Bifidobacterium* e *Clostridium* apresentaram as menores densidades. Os fatores responsáveis pelas densidades demonstradas podem estar relacionados a valores adaptativos entre os simbiontes considerados (e.g. *quorum sensing*), além de características morfofisiológicas do hospedeiro, tais como alterações na morfologia do epitélio intestinal e resposta imunológica.

Nesse contexto, *Lactobacillus* e *Salmonella* foram predominantes em densidade nas diferentes regiões do intestino cujas características fisiológicas como duodeno, jejuno e íleo (Tabela 2). Os simbiontes *Bacteroides* e *Clostridium* seguiram a mesma tendência, e apresentaram densidades inferiores a *Lactobacillus* e *Salmonella*, porém maiores se comparados a *Bifidobacterium* e *Escherichia coli*. Já os gêneros *Fusobacterium* e *Campylobacter* demonstraram densidades comparativamente inferiores. Em geral, os dados demonstraram um aumento gradativo da densidade bacteriana ao longo do trato intestinal.

Sabe-se que a comunidade bacteriana presente no trato intestinal apresenta baixa densidade nas primeiras semanas de idade, e a mesma progride conforme aumenta a idade do animal (SKLAN, 2001; VAN DER WIELEN et al., 2002).

Figura 2 - Perfil individual dos gêneros bacterianos das bactérias benéficas dentro de cada segmento intestinal ao longo da idade (semanas) de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Figura 3 - Perfil individual dos gêneros bacterianos das bactérias patogênicas dentro de cada segmento intestinal ao longo da idade (semanas) de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Tabela 2- Médias e desvios padrões para observações dentro de cada gênero bacteriano das bactérias benéficas e patogênicas nos segmentos Duodeno (D), Jejunum (J), Íleo (I) e Ceco (C) em relação a idade de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Grupo alvo	Seg./Idade	13		24		63		
		Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
Bactérias Benéficas	<i>Bacteroides</i>	C	80,231.67	7,178.24	104,302.20	8,705.80	136,826.26	26,900.43
		D	5.47	0.91	18.84	10.52	4.39	3.66
		I	96.22	33.61	107.57	147.69	100.58	78.27
		J	10.29	4.38	31.98	14.32	10.32	5.43
	<i>Bifidobacterium</i>	C	67.76	41.68	1,223.04	1,168.66	463.04	451.74
		D	2.07	1.20	1.92	1.50	1.88	0.57
		I	9.60	5.93	53.82	51.48	4.11	3.81
		J	8.48	12.13	24.21	9.61	3.13	0.33
	<i>Fusobacterium</i>	C	3,234.97	2,678.59	2,676.04	1,037.83	6,931.12	4,073.27
		D	1.39	0.33	1.82	0.29	2.37	1.07
		I	8.54	4.99	4.40	4.34	8.81	7.85
		J	1.51	0.15	1.96	0.47	2.32	0.73
	<i>Lactobacillus</i>	C	8,778.05	2,253.08	6,037.19	1,468.19	5,540.98	1,230.15
		D	31.66	22.97	20.88	13.46	154.98	145.57
		I	477.67	311.52	1,282.97	726.51	226.62	85.97
		J	75.72	51.57	465.60	230.42	522.74	505.12
Bactérias Patogênicas	<i>Campylobacter</i>	C	7.221	3.133	2.929	1.771	13.063	9.855
		D	0.075	0.021	0.058	0.018	0.060	0.030
		I	0.062	0.018	0.169	0.114	0.068	0.042
		J	0.041	0.013	0.112	0.044	0.063	0.011
	<i>Clostridium</i>	C	0.464	0.120	0.529	0.101	0.471	0.099
		D	0.490	0.139	0.512	0.219	0.376	0.098
		I	0.590	0.311	0.578	0.057	0.522	0.160
		J	0.424	0.125	0.507	0.214	0.590	0.088
	<i>Escherichia coli</i>	C	0.863	0.220	1.015	0.391	0.997	0.214
		D	0.190	0.053	0.213	0.026	0.160	0.051
		I	0.270	0.101	0.225	0.040	0.223	0.047
		J	0.188	0.089	0.236	0.094	0.228	0.044
	<i>Salmonella</i>	C	0.916	0.632	1.337	0.608	1.684	0.113
		D	1.533	0.204	1.193	0.594	1.202	0.270
		I	1.899	0.267	1.520	0.540	1.486	0.146
		J	1.459	0.216	1.144	0.531	1.558	0.192

A microbiota intestinal das aves podem ser influenciadas quanto à densidade e diversidade (STANLEY et al., 2013; VAN DER WIELEN et al., 2002; POURABEDIN; ZHAO, 2015) por diversos fatores relacionados ao sistema de manejo ou criação, tais como dieta (TOROK et al., 2008), sexo (LUMPKINS et al., 2008), genótipo (ZHAO et al., 2013), condições das instalações e temperatura (NORDENTOFT et al., 2011), cama (TOROK et al., 2009; CRESSMAN et al., 2010), alimentação restrita (CALLAWAY et al., 2009) e densidade populacional (GUARDIA et al., 2011). Além disso, à medida que a ave envelhece a complexidade da microbiota intestinal pode sofrer alterações significativas (YIN et al., 2010; CRHANNOVA et al., 2011; DANZEISEN et al., 2011; SEKELJA et al., 2012). Como consequência, bactérias podem apresentar redução populacional ou mesmo serem eliminadas do sistema ao longo do tempo. Ainda, podem apresentar um aumento gradativo na microbiota intestinal das aves mais velhas, predominando sobre outros grupos que permanecem estáveis ao longo da vida (POURABEDIN et al., 2015).

Portanto, nossos resultados apresentaram padrões semelhantes em relação à idade e as regiões intestinais avaliadas. Observamos que as comunidades bacterianas variaram consideravelmente nos segmentos ao longo do trato intestinal das aves (Figuras 4, 5, 6 e 7). *Bacteroides* aumentou gradativamente sua densidade no ceco no decorrer dos tempos analisados, atingindo o maior índice populacional durante a 63ª semana de idade do hospedeiro. De modo similar, os simbiontes intestinais *Fusobacterium*, *Salmonella* e *Campylobacter*, também evoluíram numericamente no mesmo período considerado. Entretanto, as duas últimas, apresentaram densidades inferiores quando comparadas a *Fusobacterium* e *Bacteroides*.

Adicionalmente, o grupo bacteriano *Lactobacillus* apresentou densidade maior na 13ª semana de idade, e os simbiontes *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Escherichia coli* apresentaram maior densidade na 24ª semana de idade. De acordo com Callaway et al. (2009) e Videnska et al. (2014) bactérias do filo Firmicutes são dominantes na microbiota de galinhas jovens (cerca de 4 meses de idade), enquanto os representantes de Bacteroidetes, Proteobacteria, e Enterobacteria são mais comuns em aves adultas (mais de 7 meses). As comunidades bacterianas de cada segmento do trato intestinal mostram-se diferenciadas em função de fatores inerentes do nicho ocupado, devendo ser considerados ecossistemas de transição (WIELEN et al., 2002).

A densidade de algumas bactérias pode variar bastante conforme o segmento intestinal considerado (SALANITRO et al., 1974; GONG et al., 2002; LU et al., 2003; KONSAK et al., 2013; STANLEY et al., 2014). A densidade de *Bacteroides* foi maior no ceco das galinhas

poedeiras analisadas, e as bactérias pertencentes ao Filo Firmicutes destacaram-se nas demais regiões. Entretanto, foram detectadas baixas densidades entre os grupos bacterianos no duodeno de galinhas poedeiras (DENBOW, 2000). Esse fato se deve à alta concentração salina e a grande variação do pH no lúmen (pH ácido do estômago vs. pH alcalino do suco pancreático), porém o mesmo apresenta uma camada de muco extremamente espessa, permitindo então a colonização bacteriana. Devido ao pH característico do duodeno (pH 5.0-6.0), predominam *Lactobacillus*, podendo haver ainda representantes de Clostridiales e Enterobacteriaceae em números bem menores (GONG et al., 2007).

A tendência do pH no trato intestinal é alcalinizar ao longo de sua extensão (STANELY et al., 2015) influenciando as variações na densidade microbiana, como constatado comparativamente entre os segmentos ao longo do intestino (Tabela 2). É no jejuno que ocorre a maior parte da digestão propriamente dita pela ação de enzimas pancreáticas (lúmen) e de membrana (enterócitos) (SKALAN et al., 2001).

Figura 4 - Heatmap da distribuição quantitativa dos grupos bacterianos no intestino de galinhas poedeiras na 13ª semana de idade criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Figura 5 - Heatmap mostrando a distribuição quantitativa dos grupos bacterianos no intestino de galinhas poedeiras na 24ª semana de idade criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Figura 6 - Heatmap mostrando a distribuição quantitativa dos grupos bacterianos no intestino de galinhas poedeiras na 63ª semana de idade criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Figura 7 - Distribuição quantitativa dos grupos bacterianos no intestino de galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Esse acontecimento deve-se ao fato do pH do jejuno ser mais alcalino em relação ao duodeno, variando entre 6.5-7.0. Sendo assim, o jejuno é constituído basicamente por espécies de *Lactobacillus* (FENG et al., 2010), ou seja, a comunidade colonizadora tende a ser semelhante àquela encontrada no duodeno, dominada por fermentadores de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Enterobactérias*, *Proteobactérias* e *Streptococcus*) além de alguns *Clostridiales* e *Bacteroidetes* (GONG et al., 2007).

Do mesmo modo, o íleo é composto em números variáveis por *Lactobacillus*, *Enterobacteria* e *Proteobacteria* (WISE; SIRAGUSA, 2007), *Candidatus* *Arthromitus*, *Escherichia coli* e *Clostridium* (VIVEROS et al., 2011; ASRORE et al., 2015; POURABEDIN; ZHAO, 2015), dependendo da dieta do animal. Por ser a porção final do intestino delgado, atuam ali transportadores de muco e a reabsorção de sais biliares (AMIT-ROMACH; SKLAN; UNI, 2004). As condições de pH são neutras (7.0-7.5) com renovação constante da camada de muco pela maior quantidade de células caliciformes nesta porção em relação ao duodeno e jejuno (CAMPOS, 2006). Portanto, estes influenciam positivamente a maior densidade bacteriana neste segmento intestinal (BARNES et al., 1972; BJERRUM et al., 2006).

Durante os nossos estudos, constatamos que o ceco foi o segmento que apresentou maior densidade bacteriana no trato intestinal das aves. O complexo microbiano no ceco é considerado amplo por ser tratar de um ambiente anaeróbico e condizente com os grupos aqui estudados. O mesmo representa uma câmara de fermentação, com alta produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e vitaminas (CALLAWAY et al., 2009; STANLEY et al., 2015). Além dos AGCC é descrita a absorção de hexoses e alguns aminoácidos neste segmento do intestino, os quais são provenientes da fermentação microbiana (KOUTSOS; ARIAS, 2006). Dessa forma, maior abundância e densidade populacional de microrganismos anaeróbicos devem ocorrer nesse segmento em um animal saudável e de microbiota equilibrada (MCBEE, 1970; ZHU et al., 2002; PAN; YU, 2013). Tais condições também foram detectadas em galinhas poedeiras mantidas nas condições desse estudo, que demonstrou baixa densidade de *Lactobacillus* e *Clostridium* no ceco e predominância populacional de bactérias anaeróbicas como *Bacteroides* (Tabela 2).

Padrões diferenciados de densidade bacteriana benéficas e patogênicas entre os segmentos intestinais em galinhas poedeiras foram observadas, sugerindo uma possível interação sinérgica entre ambos (Figuras 8 e 9). A densidade bacteriana benéfica foi maior em todos os segmentos estudados, evidenciando o equilíbrio da microbiota com a consequente baixa densidade de bactérias potencialmente patogênicas (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias e desvios padrões da densidade bacteriana patogênica e benéfica, por segmentos e idade (semanas) em galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

		Idade das aves (semanas)					
		13		24		63	
Bactérias	Segmentos	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Benéfica	C	23.078,115	34.061,57	28.545,84	44.879,64	37.400,45	59.951,5
	D	10,14	16,69	10,86	12,20	40,90	95,58
	I	148,00	245,92	362,19	645,25	85,03	107,10
	J	24,00	39,44	130,93	225,14	134,62	328,44
Patogênica	C	2,36	3,23	1,45	1,28	4,05	7,04
	D	0,57	0,59	0,49	0,53	0,45	0,48
	I	0,70	0,75	0,62	0,61	0,57	0,57
	J	0,52	0,58	0,49	0,48	0,61	0,60

Figura 8 - Comparação entre os gêneros das bactérias benéficas e patogênicas em galinhas poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Desse modo os resultados denotaram a condição equilibrada da microbiota intestinal das aves mantidas no sistema free-range livre de antibióticos. Qualquer fator que leve à condição de disbiose, favoreceria a instalação e multiplicação de microrganismos patogênicos (REHMAN et al., 2008; FLINT; GARNER, 2009). Ademais é evidente que uma microbiota saudável e equilibrada, consequência principalmente de fatores como nutrição, condições de conforto térmico e biossegurança adequados afetam positivamente a saúde e bem-estar das galinhas poedeiras criadas nesse sistema (STANELY et al., 2012).

Comunidades microbianas equilibradas e livres de interferências disruptivas tendem a manter-se reguladas por *quorum sensing*. Trata-se de comunicação química entre microrganismos, atuando como mecanismo regulatório entre espécies da comunidade, o que em última análise promoveria a supressão das espécies patogênicas (MILLER; BASSLER, 2001; BASSLER; LOSICK, 2006). Esse sistema de comunicação é de grande importância para a sobrevivência da espécie, pois elas passam a agir coordenadamente, e não individualmente, para realizar diversos processos como: expressão de genes de virulência,

adaptação à disponibilidade de nutrientes, defesa contra outros microrganismos, produção de antibióticos ou bacteriocinas, proteção contra componentes tóxicos, produção de enzimas, formação de biofilmes, mecanismos de diferenciação celular, esporulação, transferência de plasmídeos e simbiose com o hospedeiro (SMITH et al., 2004; BASSLER; LOSICK, 2006).

Figura 9 - Comparações duas a duas das densidades bacterianas por tipos de bactérias correspondentes a idade e segmento em aves poedeiras criadas no sistema free-range livre de antibióticos

Nesse contexto a alta densidade do simbiote *Bacteroides* e sua participação metabólica no organismo hospedeiro são importantes, atuando na manutenção das funções do intestino e na atividade imune (LAN et al., 2006), limitando a colonização de patógenos no trato gastrointestinal (GILMORE; FERRETTI, 2003). Esse fato sucede em decorrência da alta produção de proteína bacteriocina no intestino, substância antibacteriana (WEXLER, 2007). *Bacteroides* podem fermentar carboidratos com a produção de ácidos graxos voláteis absorvidos através da parede intestinal e utilizados pelo hospedeiro como fonte de energia, podendo utilizar desde açúcares simples ou complexos e polissacarídeos como nutrientes para

seu crescimento (HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 2002). Há relatos da interação mutualista entre o animal e *Bacteroides*, pois ambos são beneficiados como resultado desta relação (WEXLER, 2007).

Lactobacillus apresentam atividade inibitória tanto para bactérias Gram-negativas (*Campylobacter*) quanto para Gram-positivas, como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. (JIN et al., 1997; VICENT; VEONET; RILEY, 1959; GAST et al., 2013). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* desempenham papel importante, visto que, estimulam o sistema imune mediante a ativação dos macrófagos, e auxilia na digestão e absorção de nutrientes em face de seu envolvimento na bioquímica intestinal. Tais bactérias atuam inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, em virtude da produção de bacteriocinas, substâncias formadas por peptídeos, proteínas ou complexos proteicos e de carboidratos (TANNOCK, 1998; NAKPHAICHIT et al., 2011; VIGSNAES et al., 2011). E, por fim, simbiontes *Fusobacterium* possuem a capacidade de competir com os microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, por meio de sítios de ligação no intestino, impedindo a proliferação das bactérias patogênicas (BROWN; ROTTINGHAUSGE; WILLIAMS, 1992; APAJALAHTI; KETTUNES; GRAHAM, 2004).

Logo, para que os animais consigam expressar todo o seu potencial produtivo, é essencial que a saúde intestinal esteja bem equilibrada, promovendo a digestão e a absorção dos nutrientes presentes na ração de forma satisfatória. Entretanto, condições de disbiose favorecem a proliferação de microrganismos indesejáveis no trato gastrointestinal, e assim, afetam a absorção de nutrientes e a velocidade da passagem da digesta (VISEK, 1978) com prejuízos ao sistema imunológico intestinal.

Assim, a busca por produtos avícolas de alta qualidade pelo mercado consumidor tem exigido do setor avícola, mudanças contínuas no sistema de produção, principalmente em relação ao bem-estar dos animais. Avaliações comportamentais associadas a análises fisiológicas com foco qualitativo em ambiência, sanidade e produção, se constituem em ferramentas eficientes no julgamento do bem-estar dos animais.

Questões foram investigadas de forma inovadora no presente trabalho, evidenciando a relação de grupos microbianos intimamente relacionados ao equilíbrio da saúde intestinal de galinhas poedeiras mantidas em sistema de alto enriquecimento ambiental e livres do uso de antibióticos na alimentação. Tais informações são fundamentais para a melhoria dos sistemas de criação da indústria avícola, e servirão como uma nova ferramenta para o embasamento de novas estratégias de manejo, bem como de novos estudos visando o aprimoramento das

políticas de bem-estar das aves e o aumento da qualidade dos produtos para o mercado consumidor.

5.4 Conclusões

- Bactérias benéficas apresentaram densidades positivas ao longo do período estudado;
- As taxas de crescimento estimadas diferem para os simbiontes analisados;
- A população bacteriana benéfica prevaleceu sob as bactérias patogênicas;
- A densidade microbiana difere entre os segmentos intestinais;
- Maiores densidades foram observadas no ceco; entre as bactérias benéficas *Bacteroides* apresentou maior densidade e *Campylobacter* predominou entre as patogênicas;
- O estudo da microbiota intestinal em galinhas poedeiras no sistema avaliado revelou-se uma excelente ferramenta para avaliar o nível de bem-estar dos animais.

Referências

ABEYESINGHE, S.M.; WATHES, C.M.; NICOL, C.J. et al. The aversion of broiler chickens to concurrent vibration and thermal stressors. **Applied Animal Behaviour Science**, Netherlands, v.73, n. 3, p.199-215, 2001.

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 1093-1098, 2004.

ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 260-271, 2010.

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

ASRORE, S.M.M.; SIEO, C.C.; CHONG, C.W.; GAN, H.M.; HO, Y.W. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**, England, v. 26, p. 4-7, 2015.

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

BASSLER, B.L.; LOSICK, R. Bacterially speaking. **Cell**, United States, v. 125, p. 237-246, 2006.

BJERRUM, L.; ENGBERG, R.M.; LESER, T.D.; JENSEN, B.B.; FINSTER, K.; PEDERSEN, K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, p. 1151-1164, 2006.

CALLAWAY, T.; DOWD, S.; WOLCOTT, R.; SUM, Y.; MCREYNOLDS, J.L.; ENDRINGTON, T.S.; BYRD, J.A.; ANDERSON, R.C.; KRUEGER, N.; NISBET, D.J. Evaluation of the bacterial diversity in cecal contents of laying hens fed various molting diets by using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 298-302, 2009.

CAMPOS, D.M.B. **Efeito do sorgo sobre o desempenho zootécnico, características de carcaça e o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos**. 2006. 49 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CLIFFORD, R.J.; MILILLO, M.; PRESTWOOD, J.; QUINTERO, R.; ZURAWSKI, D.V.; KWAK, Y.I.; WATERMAN, P.E.; LESH, E.P.; MC GANN, P. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by Real-Time PCR. **PLoS ONE**, United States, v. 7, n. 11, p. 1-6, 2012.

CSH, P. Phosphate-buffered saline (PBS). **Cold Spring Harbor Protocols**, São Paulo, v.1, p.12, 2006.

COLOMER-LLUCH, M.; IMAMOVIC, L.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 55, n. 10, p. 4908-4911, 2011.

COOPER, J.J.; ALBENTOSA, M.J. Behavioural priorities of laying hens. **Avian and Poultry Biology Reviews**, London, v. 14, p. 127-149, 2003.

CRESSMAN, M.D.; ZHONGTANG, Y.; NELSON, M.C.; MOELLER, S.J.; LIBUM, M.S.; ZERBY, H.N. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 6572-6582, 2010.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNNOVA, M.; MATULOVA, M.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. **Infection and Immunity**, United States, v. 79, p. 2755-2763, 2011.

CROMWELL, G.L. **Antimicrobial agents**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. 314 p.

DANZEISEN, J.L.; KIM, H.B.; ISAACSON, R.E.; TU, Z.J.; JOHNSON, T.J. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. **PLoS One**, United States, v. 11, p. 1-14, 2011.

D'COSTA, V.M.; KING, C.E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W.W.L.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G.B.; POINAR, H.N.; WRIGHT, G.D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, United Kingdom, v. 477, p. 457-461, 2011.

DEMATTE FILHO, L.C. **Sistema agroalimentar da avicultura fundada em princípios da agricultura natural: multifuncionalidade, desenvolvimento territorial e sustentabilidade.** 2014. 260 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo, Piracicaba, 2014.

DENBOW, D.M. **Sturkie's Avian Physiology.** San Diego: Academic Press, 2000. 1056 p.

FENG, Y.; GONG, J.; YU, H.; JIN, Y.; ZHU, J.; HAN, Y. Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 116-121, 2010.

FINLEY, R.L.; COLLIGNON, P.; LARSSON, D.G.; MCEWEN, S.A.; LI, X.Z.; GAZE, W.H.; REID-SMITH, R.; TIMINOUNI, M.; GRAHAM, D.W.; TOPP, E. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. **Clinical Infectious Diseases**, United States, v. 57, n. 5, p. 704-710, 2013.

FLINT, J.F.; GARNER, M.R. Feeding beneficial bacteria: A natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. **The Journal Applied Poultry Research**, United States, v. 18, n. 2, p. 367-378, 2009.

FUKUSHIMA, H.; KATSUBE, K.; HATA, Y.; KISHI, R.; FUJIWARA, S. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 73, n. 1, p. 92-100, 2007.

GAST, R.K.; GURAYA, R.; JONES, D.R.; ANDERSON, K.E.; KRACHER, D.M. Colonization of internal organs by *Salmonella enteritidis* in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, p. 468-473, 2013.

GEDEK, B. Intestinal flora and bioregulation. **Revue scientifique et technique**, France, v. 8, n. 2, p.417-437, 1989.

GILMORE, M.S.; FERRETTI, J.J. The thin line between gut commensal and pathogen. **Science**, United States, v. 299, p. 1999-2002, 2003.

GONG, J.; FORSTER, R. J.; HUANG, R.; YU, H. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiological Letters**, United States, v. 208, p. 1-7, 2002.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R. J.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; YANG, C.; HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **Microbiology Ecology**, Champaign, v. 59, p. 147-157, 2007.

GUARDIA, S.; KONSAK, B.; COMBES, S.; LENEVEZ, F.; CAUQUIL, L.; GUILLOT, J.F.; MOREAU- VAUZELLE, C.; LESSIRE, M.; JUIM, H.; GABRIEL, I. Effects of stocking density on the growth performance and digestive microbiota of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 1878-1889, 2011.

GUNAL, M.; YAYLI, G.; KAYA, O.; KARAHAN, N.; SULAK, O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v. 5, n. 2, p. 149-155, 2006.

HASSENA, A.B.; BARKALLAH, M.; FENDRI, I.; GROSSET, N.; NEILA, I.B.; GAUTIER, M.; GDOURA, R. Real time PCR gene profiling and detection of *Salmonella* using a novel target: The *siiA* gene. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 109, p. 9-15, 2015.

HEILIG, H.G.H.J.; ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E.E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A.D.L.; DE VOS, W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 68, p. 114-123, 2002.

HOOPER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annual Review of Nutrition**, United States, v. 22, p. 283-307, 2002.

HUMPHREY, T. Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility. **British Poultry Science**, United Kingdom, v. 47, p. 379-391, 2006.

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

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABOULLAH, N.; JALALUDIN, S. ProbiOlics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, United Kingdom, v. 53, p. 351-68, 1997.

KINIEREM, U. Animal welfare aspects of outdoor runs for laying hens: a review. **Wageningen Journal of Life Sciences**, United States, v. 54, n. 2, p. 133-145, 2006.

KORVER, D.R. Overview of the immune dynamics of the digestive system. **The Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 15, p. 123-135, 2006.

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

LAN, P.T.; SAKAMOTO, M.; SAKATA, S.; BENNO, Y. *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 56, p. 2853-2859, 2006.

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

LAYTON, A.; MCKAY, L.; WILLIAMS, D.; GARRETT, V.; GENTRY, R.; SAYLER, G. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene taqman-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 72, n. 6, p. 4214-4224, 2006.

LEBLANC-MARIDOR, M.; GARÉNAUX, A.; BEAUDEAU, F.; CHIDAINÉ, B.; SEEGER, H.; DENIS, M.; BELLOC, C. Quantification of *Campylobacter* spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 85, p. 53-61, 2011.

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**, United States, v. 69, p. 6816-6824, 2003.

LUMPKINS, B.; BATAL, A.; LEE, M. The effect of gender on the bacterial community in the gastrointestinal tract of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, p. 964-970, 2008.

MARCH, B.E. The host and its microflora: An ecological unit. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, n. 3, p. 857-867, 1979.

MCBEE, R.H. Metabolic contributions of the cecal flora. **The American Journal of Clinical Nutrition**, United States, v. 23, p. 1514-1518, 1970.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: 38^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p. 141-157.

MILES, R.D. **Biotechnology in the feed industry: proceedings of Alltech's ninth annual symposium**. Nottingham: University Press, 1993. 244 p.

MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, United States, v. 55, p. 165-199, 2001.

MODI, S.R.; COLLINS, J.J.; RELMAN, D.A. Antibiotics and the gut microbiota. **The Journal of clinical investigation**, United States, v.124, p. 4212-4218, 2014.

NAKPHAICHIT, M. THANOMWONGWATTANA, S.; PHRAEPHAISARN, C.; SAKAMOTO, N.; KEAWSOMPONG, S.; NAKAYAMA, J.; NITISINPRASERT, S. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 2753-2765, 2011.

NORDENTOFT, S.; MOLBAK, L.; BJERRUM, L.; VYLDER, J.D.; IMMERSEEL, F.V.; PEDERSEN, K. The influence of the cage system and colonisation of *Salmonella* Enteritidis on the microbial gut flora of laying hens studied by T-RFLP and 454 pyrosequencing. **BMC Microbiology**, United Kingdom, v. 11, p. 180-187, 2011.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, United Kingdom, v. 5, p. 108-119, 2013.

POURABEDIN, M.; ZHAO, X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. **Microbiology Letters**, United Kingdom, v. 362, n. 15, p. 1-8, 2015.

REHMAN, H.; HELLWEG, P.; TARAS, D.; ZENTEK, J. Effects of dietary inulin on the intestinal short chain fatty acids and microbial ecology in broiler chickens as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, p. 783-790, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.

SEKELJA, M.; RUD, I.; KNUTSEN, S.; DENSTADLI, V.; WESTERENG, B.; NAES, T.; RUDI, K. Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 78, n. 8, p. 2941-2948, 2012.

SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, United States, v. 57, p. 415-428, 2001.

STANELY, 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 different feed conversion efficiency in chickens. **Applied Microbiological Biotechnology**, Germany, v. 96, p. 1361-1369, 2012.

_____. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. **BioMed Central microbiology**, England, v. 15, p. 2-11, 2015.

TANNOCK, G.W.; SAVAGE, D.C. influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, United States, v. 9, n. 3, p. 591-598, 1974.

TANNOCK, G.W. Studies of the Intestinal Microflora: A Prerequisite for the Development of Probiotics. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 6, p. 527-533, 1998.

TOROK, V.A.; OPHEL-KELLER, K.; LOO, M.; HUGHES, R.J. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 783-791, 2008.

_____. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, Oxford, n. 88, p. 2474-2481, 2009.

_____. 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 DER WIELEN, P.W.J.J.; LIPMAN, L.J.A.; KANAPEN, F.; BIESTERVELD, S. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 68, n. 2, p. 555-559, 2002.

VICENT, J.O.; VEONET, R.C.; RILEY, R.O. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Bacteriology**, United States, v. 78, p. 77-84, 1959.

- VIDENSKA, P.; FALDYNOVA, M.; JURICOVA, H.; BABAK, V.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; RYCHLIK, I. Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin. **BMC Veterinary Research**, United Kingdom, v. 9, p. 23-30, 2014.
- VIGSNÆS, L.K.; HOLCK, J.; MEYER, A.S.; LICHT, T.R. *In vitro* fermentation of sugar beet arabinose-oligosaccharides by fecal microbiota obtained from patients with ulcerative colitis to selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 77, n. 23, p. 8336-8344, 2011.
- WISE, W.J. The mode of growth promotion by antibiotics. **Journal of Animal Science**, United States, v. 46, p. 1447-1469, 1978.
- VIVEROS, A.; CHAMORRO, S.; PIZARRO, M.; ARIJA, I.; CENTENO, C.; BRENES, A. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 566-578, 2011.
- WEXLER, H.M. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews** United States, v. 20, n. 4, p. 593-621, 2007.
- WHELAN, J.A.; RUSSELL, N.B.; WHELAN, M.A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **Journal of Immunology Methods**, Netherlands, v. 278, p. 261-269, 2003.
- WISE, M.G.; SIRAGUSA, G.R. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 102, p. 1138-1149, 2007.
- YEGANI, M.; KORVER, D.R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, p. 2052-2063, 2008.
- YIN, Y.; LEI, F.; ZHU, L.; LI, S.; WU, Z.; ZHANG, R.; GAO, G.F.; ZHU, B.; WANG, X. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. **The ISME Journal**, England, v. 4, n. 3, p. 367-376, 2010.
- ZOETENDAL, E.G.; COLLIER, C.T.; KOIKE, S.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. **Journal of Nutrition**, United States, v. 134, p. 465-472, 2004.
- ZHAO, L.; WANG, G.; SIEGEL, P.; HE, C.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZHAI, Z.; TIAN, F.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; SUN, Z.; CHEN, W.; ZHANG, Y.; MENG, H. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. **Scientific Reports**, England, v. 3, p. 1160-1163, 2013.
- ZHU, X.Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y.; JOERGER, R.D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 68, p. 124-137, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela de Entalpia para aves poedeiras

NUPEA - ESALQ - USP															
TABELA PRÁTICA PARA AVALIAÇÃO DO AMBIENTE DE GALPÕES DE POEDEIRAS															
Faixa de Conforto para Poedeiras (Produção) - H variando de 50,0 a 68,8 KJ/Kg ar seco															
Temperatura (°C)															
UR (%)	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
40	46,2	48,5	50,9	53,4	55,9	58,5	61,2	64,0	66,9	69,8	72,9	76,1	79,3	82,7	86,2
41	46,8	49,1	51,5	54,0	56,6	59,2	62,0	64,8	67,7	70,7	73,8	77,1	80,4	83,8	87,4
42	47,3	49,7	52,1	54,6	57,3	59,9	62,7	65,6	68,6	71,6	74,8	78,1	81,5	85,0	88,6
43	47,8	50,2	52,7	55,3	57,9	60,7	63,5	66,4	69,4	72,5	75,7	79,1	82,5	86,1	89,8
44	48,3	50,8	53,3	55,9	58,6	61,4	64,2	67,2	70,2	73,4	76,7	80,1	83,6	87,2	90,9
45	48,9	51,3	53,9	56,5	59,3	62,1	65,0	68,0	71,1	74,3	77,6	81,1	84,6	88,3	92,1
46	49,4	51,9	54,5	57,2	59,9	62,8	65,7	68,8	71,9	75,2	78,6	82,1	85,7	89,4	93,3
47	49,9	52,5	55,1	57,8	60,6	63,5	66,5	69,6	72,8	76,1	79,5	83,0	86,7	90,5	94,5
48	50,5	53,0	55,7	58,4	61,3	64,2	67,2	70,4	73,6	77,0	80,4	84,0	87,8	91,6	95,6
49	51,0	53,6	56,3	59,1	61,9	64,9	68,0	71,2	74,5	77,9	81,4	85,0	88,8	92,8	96,8
50	51,5	54,1	56,9	59,7	62,6	65,6	68,7	72,0	75,3	78,7	82,3	86,0	89,9	93,9	98,0
51	52,0	54,7	57,5	60,3	63,3	66,3	69,5	72,7	76,1	79,6	83,3	87,0	90,9	95,0	99,2
52	52,6	55,3	58,1	60,9	63,9	67,0	70,2	73,5	77,0	80,5	84,2	88,0	92,0	96,1	100,3
53	53,1	55,8	58,7	61,6	64,6	67,7	71,0	74,3	77,8	81,4	85,2	89,0	93,0	97,2	101,5
54	53,6	56,4	59,2	62,2	65,3	68,4	71,7	75,1	78,7	82,3	86,1	90,0	94,1	98,3	102,7
55	54,1	56,9	59,8	62,8	65,9	69,2	72,5	75,9	79,5	83,2	87,0	91,0	95,1	99,4	103,9
56	54,7	57,5	60,4	63,5	66,6	69,9	73,2	76,7	80,3	84,1	88,0	92,0	96,2	100,5	105,0
57	55,2	58,1	61,0	64,1	67,3	70,6	74,0	77,5	81,2	85,0	88,9	93,0	97,3	101,7	106,2
58	55,7	58,6	61,6	64,7	67,9	71,3	74,7	78,3	82,0	85,9	89,9	94,0	98,3	102,8	107,4
59	56,3	59,2	62,2	65,4	68,6	72,0	75,5	79,1	82,9	86,8	90,8	95,0	99,4	103,9	108,6
60	56,8	59,7	62,8	66,0	69,3	72,7	76,2	79,9	83,7	87,7	91,8	96,0	100,4	105,0	109,7
61	57,3	60,3	63,4	66,6	70,0	73,4	77,0	80,7	84,6	88,5	92,7	97,0	101,5	106,1	110,9
62	57,8	60,9	64,0	67,3	70,6	74,1	77,7	81,5	85,4	89,4	93,6	98,0	102,5	107,2	112,1
63	58,4	61,4	64,6	67,9	71,3	74,8	78,5	82,3	86,2	90,3	94,6	99,0	103,6	108,3	113,3
64	58,9	62,0	65,2	68,5	72,0	75,5	79,2	83,1	87,1	91,2	95,5	100,0	104,6	109,4	114,4
65	59,4	62,5	65,8	69,1	72,6	76,2	80,0	83,9	87,9	92,1	96,5	101,0	105,7	110,6	115,6
66	59,9	63,1	66,4	69,8	73,3	76,9	80,7	84,7	88,8	93,0	97,4	102,0	106,7	111,7	116,8
67	60,5	63,7	67,0	70,4	74,0	77,7	81,5	85,5	89,6	93,9	98,3	103,0	107,8	112,8	118,0
68	61,0	64,2	67,6	71,0	74,6	78,4	82,2	86,3	90,4	94,8	99,3	104,0	108,8	113,9	119,1
69	61,5	64,8	68,2	71,7	75,3	79,1	83,0	87,1	91,3	95,7	100,2	105,0	109,9	115,0	120,3
70	62,1	65,3	68,8	72,3	76,0	79,8	83,7	87,9	92,1	96,6	101,2	106,0	110,9	116,1	121,5
71	62,6	65,9	69,3	72,9	76,6	80,5	84,5	88,7	93,0	97,5	102,1	107,0	112,0	117,2	122,7
72	63,1	66,5	69,9	73,6	77,3	81,2	85,2	89,4	93,8	98,3	103,1	108,0	113,1	118,3	123,8
73	63,6	67,0	70,5	74,2	78,0	81,9	86,0	90,2	94,7	99,2	104,0	109,0	114,1	119,5	125,0
74	64,2	67,6	71,1	74,8	78,6	82,6	86,7	91,0	95,5	100,1	104,9	110,0	115,2	120,6	126,2
75	64,7	68,1	71,7	75,4	79,3	83,3	87,5	91,8	96,3	101,0	105,9	110,9	116,2	121,7	127,4
76	65,2	68,7	72,3	76,1	80,0	84,0	88,3	92,6	97,2	101,9	106,8	111,9	117,3	122,8	128,5
77	65,7	69,3	72,9	76,7	80,6	84,7	89,0	93,4	98,0	102,8	107,8	112,9	118,3	123,9	129,7
78	66,3	69,8	73,5	77,3	81,3	85,5	89,8	94,2	98,9	103,7	108,7	113,9	119,4	125,0	130,9
79	66,8	70,4	74,1	78,0	82,0	86,2	90,5	95,0	99,7	104,6	109,7	114,9	120,4	126,1	132,1
80	67,3	70,9	74,7	78,6	82,7	86,9	91,3	95,8	100,5	105,5	110,6	115,9	121,5	127,2	133,2
81	67,9	71,5	75,3	79,2	83,3	87,6	92,0	96,6	101,4	106,4	111,5	116,9	122,5	128,4	134,4
82	68,4	72,1	75,9	79,9	84,0	88,3	92,8	97,4	102,2	107,3	112,5	117,9	123,6	129,5	135,6
83	68,9	72,6	76,5	80,5	84,7	89,0	93,5	98,2	103,1	108,1	113,4	118,9	124,6	130,6	136,8
84	69,4	73,2	77,1	81,1	85,3	89,7	94,3	99,0	103,9	109,0	114,4	119,9	125,7	131,7	137,9
85	70,0	73,7	77,7	81,8	86,0	90,4	95,0	99,8	104,8	109,9	115,3	120,9	126,7	132,8	139,1