

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**RAFAELA BERTO**

**PROBIÓTICOS À BASE DE *BACILLUS* EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE  
DESAFIADOS COM *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* E *EIMERIA* VACINAL**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**RAFAELA BERTO**

**PROBIÓTICOS À BASE DE *BACILLUS* EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE  
DESAFIADOS COM *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* E *EIMERIA* VACINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2023**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Berto, Rafaela  
Probióticos a base de Bacillus em rações de frangos de corte desafiados com Clostridium perfringens e Eimeria vacinal / Rafaela Berto; orientadora Ricardo Vianna Nunes; coorientadora Cinthia Eyng. -- Marechal Cândido Rondon, 2023.  
68 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2023.

1. Enterite Necrótica : 2. Coccidiose : 3. Bacillus. I. Nunes, Ricardo Vianna , orient. II. Eyng, Cinthia, coorient. III. Título.

---

**RAFAELA BERTO**

**Probióticos a base de *Bacillus* em rações de frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* vacinal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de "Mestra em Zootecnia", Área de Concentração em "Produção e Nutrição Animal", Linha de Pesquisa "Produção e nutrição de não-ruminantes/aquicultura", APROVADA pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador / Presidente – Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Campus de Mal. Cândido Rondon

Coordenadora – Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cinthia Eyng  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Campus de Mal. Cândido Rondon

Membro – Dr. Alberto Back  
MercoLab

Membro – Dr. Vinicius de Quiroz Teixeira  
Evonik

Marechal Cândido Rondon, 17 de março de 2023.



Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

#### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes**, declaro como **ORIENTADOR** que presidi os trabalhos de defesa à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Rafaela Berto**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da Banca Examinadora, **formalizo como Orientador**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da Banca Examinadora de que a candidata foi considerada **APROVADA** na banca realizada em 17/03/2023, com o trabalho intitulado "**Probióticos a base de *Bacillus* em rações de frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Eimeria vacinal***".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

**Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes** – ORIENTADOR/PRESIDENTE  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / Campus de Mal. Cândido Rondon  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

*Modelo 2 – Para orientador(a) da Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE*



Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78880.937/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284 7878 - Fax: (45) 3284 7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ  
GOVERNO DO ESTADO

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

#### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.ª Dr.ª Cinthia Eyng**, declaro que participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Rafaela Berta**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, formalizo como **Coorientadora**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada **APROVADA** na banca realizada em 17/03/2023, com o trabalho intitulado "**Probióticos a base de *Bacillus* em rações de frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Himeria* vacinal**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

*Cinthia Eyng*

**Prof.ª Dr.ª Cinthia Eyng - Coorientadora**  
Unioeste / Campus de Mal. Cândido Rondon  
Centro de Ciências Agrárias



Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

#### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE Mestrado REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Dr. Vinicius de Queiroz Teixeira**, declaro que **participo à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Rafaela Berto**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada **APROVADA** na banca realizada em 17/03/2023, com o trabalho intitulado **"Probióticos a base de *Bacillus* em rações de frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Elmeria vacinal*".**

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Sem restrições.

**Dr. Vinicius de Queiroz Teixeira**  
Evonik





**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA**

Eu, **Dr. Alberto Back**, declaro que participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Rafaela Berto**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, formalizo como **Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada **APROVADA** na banca realizada em 17/03/2023, com o trabalho intitulado "**Probióticos a base de *Bacillus* em rações de frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Eimeria vacinal***".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Alberto Back**  
Mercolab

*Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE*



## **DEDICATÓRIA**

Ao meu filho José Henrique. Os filhos são herança do Senhor, uma recompensa que ele dá. Como flechas nas mãos do guerreiro são os filhos nascidos na juventude. Como é feliz o homem que tem a sua aljava cheia deles.

Salmo127: 3-5

## **AGRADECIMENTOS**

Meu Deus, hoje meu coração exulta de gratidão e alegria por mais esta vitória alcançada. Este triunfo não é apenas meu, mas antes ele é Teu, meu Deus, pois eu sei que jamais seria possível sem a Tua ajuda e vontade divinas.

A Unioeste, por ter fornecido os conhecimentos necessários que sempre servirão de base para minha vida profissional e que me concedeu a realização de um grande sonho.

À minha família, por estar sempre ao meu lado, direcionando-me a tomar as decisões corretas, servindo de apoio nos momentos difíceis.

Em especial ao meu pai Nelcir Paulo Berto, um grande homem do campo e que sempre me ensinou a lida campeira, tenho muito orgulho de ser sua filha.

À minha mãe Justina Inês Bazzotti Berto, uma mulher guerreira, especial, que sempre me apoiou e deu-me forças para seguir em frente em minha jornada profissional.

Ao meu marido Henrique Pinheiro, que carinhosamente sempre esteve ao meu lado apoiando-me e incentivando-me em mais uma escolha.

Ao meu professor Orientador Dr. Ricardo Nunes, pela atenção e compreensão na realização deste trabalho.

## PROBIÓTICOS À BASE DE *BACILLUS* EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* E *EIMERIA* VACINAL

**Resumo** - O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de dois probióticos (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940; Ecobiol<sup>®</sup> e *Bacillus subtilis* DSM 32315; GutCare<sup>®</sup>) em substituição a um antibiótico no desempenho, rendimento de carcaça e cortes, morfometria e escore de lesão intestinal, parâmetros bioquímicos do sangue e concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* vacinal. Um total de 880 machos Cobb 500, com um dia de idade (peso 43,48 ± 0,55g) foram distribuídos em 4 tratamentos com 10 repetições e com 22 aves cada, em um delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos utilizados foram distribuídos da seguinte forma: ração controle negativo (CN) sem a inclusão de aditivo alimentar; ração controle positivo (CP) + 100 g ton<sup>-1</sup> de enramicina 8%; ração CN + 1000 g ton<sup>-1</sup> de produto à base de Ecobiol<sup>®</sup> - CECT 5940 (1,0 x 10<sup>6</sup> UFC/g de ração de *B. amyloliquefaciens* BA) e ração CN + 500 g ton<sup>-1</sup> de produto à base de GutCare<sup>®</sup> - DSM 32315 (1,0 x 10<sup>6</sup> UFC/g de ração de *B. subtilis* BS). Para induzir a enterite necrótica, todas as aves foram inoculadas via gavagem aos 4 dias de idade com 20 vezes a dose da vacina contra coccidiose (0,6 mL/ave de Biococcivet R<sup>®</sup>) e aos 7 e 10 dias de idade com 0,5mL da cepa de *C. perfringens* (10<sup>8</sup> UFC/mL) isolada a campo de um surto de enterite necrótica. Os índices zootécnicos foram determinados aos 28 e 42 dias de idade. Também aos 42 dias foi realizada a avaliação do rendimento de carcaça e cortes. As concentrações de AGCC e histomorfometria intestinal foram realizadas aos 28 dias. A coleta de sangue para avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos foi realizada aos 21 dias de idade. Os frangos alimentados com a dieta CN tiveram o menor consumo de ração (P < 0,0001), pior ganho de peso corporal (P < 0,0001) e pior conversão alimentar (P < 0,0001) frente aos demais tratamentos. No entanto, os frangos alimentados com as dietas BA e BS tiveram consumo de ração e ganho de peso corporal significativamente maiores, além de melhor conversão alimentar em comparação com as aves alimentadas com a dieta CP. No duodeno, os tratamentos CP, BA e BS tiveram vilosidades mais altas (P < 0,001). As dietas CP, BA e BS apresentaram maior altura de vilosidade, profundidade de cripta e área de absorção (P < 0,001) no jejuno em relação às aves CN. A suplementação com BA 1000 g ton<sup>-1</sup> e BS 500 g ton<sup>-1</sup> melhorou o desempenho de frangos de corte em relação ao antibiótico enramicina com características morfológicas intestinais semelhantes, ao mesmo tempo que o BA 1000 g ton<sup>-1</sup> favoreceu uma maior produção de ácido butírico pela microbiota intestinal. Portanto, o uso dos probióticos à base de *Bacillus* adicionados à ração foram capazes de substituir efetivamente o uso do antibiótico enramicina 8% sob um desafio intestinal induzido padronizado, sem alteração no perfil bioquímico e enzimático das aves.

**Palavras-chave:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, coccidiose, enterite necrótica.

## **BACILLUS-BASED PROBIOTICS IN BROILER CHICKEN DIETS CHALLENGED WITH *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* AND VACCINE *EIMERIA***

**Abstract** – The objective of the present study was to evaluate the use of two probiotics (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940: Ecobiol® and *Bacillus subtilis* DSM 32315: GutCare®) as a replacement for an antibiotic in the performance, carcass, and cut yields, intestinal morphometry and lesion score, blood biochemical parameters, and short-chain fatty acid (SCFA) concentration in broilers challenged with *Clostridium perfringens* and *Eimeria* vaccine. A total of 880 one-day-old Cobb 500 males (weight:  $43.48 \pm 0.55$ g) were assigned to 4 treatments with 10 replicates and 22 birds each, in an entirely randomized design. The treatments used were distributed as follows: negative control feed (NC) without the inclusion of feed additives; positive control feed (PC) +  $100 \text{ g ton}^{-1}$  of 8% enramycin; NC feed +  $1000 \text{ g ton}^{-1}$  of Ecobiol® - CECT 5940 ( $1.0 \times 10^6$  CFU/g of *B. amyloliquefaciens* BA feed); NC feed +  $500 \text{ g ton}^{-1}$  of GutCare® - DSM 32315 ( $1.0 \times 10^6$  CFU/g of *B. subtilis* BS feed). To induce necrotic enteritis, all birds were inoculated by gavage at 4 days of age with 20 times the dose of coccidiosis vaccine (0.6 mL/bird of Biococcivet R®) and at 7 and 10 days of age with 0.5 mL of *C. perfringens* culture ( $10^8$  CFU/mL) isolated in the field from an outbreak of necrotic enteritis. The zootechnical parameters were determined at 28 and 42 days of age, and at 42 days, the carcass and cut yields were evaluated. The concentrations of SCFA and intestinal histomorphometry were performed at 28 days of age. The blood harvest for the evaluation of biochemical and enzymatic parameters was performed at 21 days of age. Chickens fed the NC diet had the lowest feed intake ( $P < 0.0001$ ), body weight gain ( $P < 0.0001$ ), and worst feed conversion ( $P < 0.0001$ ) compared to the other treatments. However, the chickens fed diets BA and BS had significantly higher feed intake and body weight gain and better feed conversion compared to the birds fed the PC diet. In the duodenum, the PC, BA, and BS treatments had higher villi ( $P < 0.001$ ). The PC, BA, and BS diets had higher villus height, crypt depth, and absorptive area ( $P < 0.001$ ) in the jejunum compared to the NC. Supplementation with Ecobiol® - CECT 5940 ( $1000 \text{ g ton}^{-1}$ ) and GutCare® - DSM 32315 ( $500 \text{ g ton}^{-1}$ ) improved broiler performance relative to the antibiotic enramycin with similar intestinal morphological characteristics, while BA ( $1000 \text{ g ton}^{-1}$ ) favored greater butyric acid production by the intestinal microbiota. Therefore, the use of *Bacillus* probiotics added to the feed was able to effectively replace the use of the antibiotic enramycin 8% under an induced intestinal challenge, with no change in the biochemical and enzymatic profile of the birds.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, coccidiosis, necrotic enteritis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação entre os tipos de <i>C. perfringens</i> e sua patogenicidade.....	23
Tabela 2. Regulamentações sobre o uso de antibióticos como promotores de crescimento em diferentes países.....	25
Tabela 3. Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	44
Tabela 4. Desempenho de frangos de corte, de 1 a 28 e de 1 a 42 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e <i>C. perfringens</i> e alimentados com dietas suplementadas com probióticos <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e antibiótico enramicina .....	49
Tabela 5. Rendimento de carcaça e cortes, percentual de gordura abdominal e peso relativo do fígado em frangos de corte, aos 42 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e <i>C. perfringens</i> e alimentados com dietas suplementadas com probióticos <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e antibiótico enramicina.....	51
Tabela 6. Perfil bioquímico sérico de frangos de corte, aos 21 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e <i>C. perfringens</i> e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e antibiótico enramicina.....	53
Tabela 7. Perfil enzimático sérico de frangos de corte, aos 21 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e <i>C. perfringens</i> e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e antibiótico enramicina.....	53
Tabela 8. Morfometria intestinal do duodeno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e <i>C. perfringens</i> e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e antibiótico enramicina .....	55
Tabela 9. Morfometria intestinal do jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e <i>C. perfringens</i> e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e antibiótico enramicina.....	55
Tabela 10. Média do escore de lesão intestinal de frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e alimentados com dietas suplementadas com probióticos <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> e antibiótico enramicina.....	57
Tabela 11. Ácidos graxos de cadeia curta (mmol kg <sup>-1</sup> ) em frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com <i>Eimeria</i> vacinal e <i>C. perfringens</i> e alimentados com dietas	

suplementadas com probióticos de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina.....58

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO.....	18
2.1 Enterite necrótica na avicultura .....	18
2.2 <i>Eimeria</i> spp. como fator predisponente para a enterite necrótica.....	19
2.3 Enterite necrótica por <i>Clostridium perfringens</i> .....	21
2.4 Uso de antibióticos e suas proibições .....	23
2.5 Probióticos .....	27
2.6 Probióticos de <i>Bacillus</i> spp.....	30
2.7 Referências.....	32
3. PROBIÓTICOS À BASE DE <i>BACILLUS</i> EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> E <i>EIMERIA</i> VACINAL.....	39
3.1 Introdução .....	41
3.2 Material e métodos.....	42
3.2.1 Desempenho zootécnico.....	45
3.2.2 Rendimento de carcaça, cortes e peso relativo dos órgãos .....	45
3.2.3 Parâmetros bioquímicos .....	45
3.2.4 Morfometria intestinal.....	46
3.2.5 Determinação macroscópica do escore de lesão intestinal.....	47
3.2.6 Determinação dos ácidos graxos de cadeia curta .....	47
3.2.7 Análise estatística.....	48
3.3 Resultados e discussão.....	49
3.4 Conclusão.....	60
3.5 Referências.....	60



## 1. INTRODUÇÃO

Desde 1960, o setor avícola mundial cresceu exponencialmente, passando de 9 para 132 milhões de toneladas de carne de frango produzidas anualmente. Esse crescimento é multifatorial e está diretamente relacionado à qualidade nutricional da carne e à rápida produção a um custo relativamente baixo e preço acessível, tornando o frango a carne mais consumida em todo o mundo (AYALEW et al., 2022).

Atualmente, os Estados Unidos da América detêm 17% da produção global, seguidos pela China e pelo Brasil. O Brasil se destaca mundialmente como o terceiro maior produtor de carne de frango, com mais de 14 milhões de toneladas produzidas, ocupando a primeira posição em exportação (ABPA, 2022).

Com a produção em larga escala, o setor avícola busca continuamente aumentar o desempenho zootécnico e a produtividade sem reduzir o bem-estar animal (SAKAMOTO et al., 2020). Logo, para melhorar o desempenho das aves e prevenir infecções, o uso de antibióticos em doses subterapêuticas na indústria avícola tornou-se uma prática comum por décadas. Contudo, apesar dos benefícios comprovados dos antibióticos, o gradativo aumento na transferência direta ou indireta de genes de resistência microbiana levou vários países a restringirem o uso dessas substâncias na produção animal (GADDE et al., 2017a; RAHMAN et al., 2022).

Consequentemente, o desuso de antimicrobianos na ração, associado a alterações no manejo nutricional e à maior densidade de criação, aumentou o desafio frente a patógenos entéricos, o que contribuiu para a crescente incidência de enterite necrótica (EN) em frangos de corte (TIMBERMONT et al., 2011; PAIVA; MCELROY, 2014).

O principal agente causador de EN em aves é a bactéria gram-positiva anaeróbia *Clostridium perfringens*. Assim, um fator determinante para o surgimento dessa doença é a presença de *Eimeria* spp., um protozoário causador da coccidiose aviária (PAIVA; MCELROY, 2014; M'SADEQ et al., 2015).

O protozoário *Eimeria* spp. causa lesões nos enterócitos que compõem o epitélio intestinal das aves, promovendo extravasamento de líquido intracelular, o qual se torna um meio de cultura ideal para a proliferação de *C. perfringens*. Essa bactéria nativa da microbiota intestinal, ao se multiplicar de forma desenfreada, promove disbiose e secreta toxinas que lesionam o intestino, causando necrose (ADHIKARI et al., 2020; ABD EL-HACK et al., 2022).

Com o aumento dos casos de doenças entéricas na avicultura e com a redução no uso de antibióticos como promotores de crescimento, surgem como alternativa os aditivos alimentares,

como os probióticos. Esses aditivos são definidos como microrganismos vivos que, utilizados em quantidades adequadas, promovem melhora na saúde do hospedeiro (KRYSIK et al., 2021).

Entre as bactérias e fungos de interesse, destacam-se as cepas de *Bacillus* spp. como excelentes candidatas para uso na suplementação alimentar em aves. Por se tratar de uma bactéria formadora de esporos, apresenta resistência a condições ambientais adversas, principalmente a variações de temperatura e pH, o que facilita sua manipulação a nível industrial (JHA et al., 2020; KULKARNI et al., 2022).

Estudos têm demonstrado que a inclusão dietética de probióticos formulados a partir de cepas de *Bacillus* spp. diminuíram a população de *C. perfringens* no ceco e íleo, conseqüentemente, melhorando a saúde intestinal, o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar em frangos induzidos a EN (WHELAN et al., 2019; HERNANDEZ-PATLAN et al., 2019; ZHAO et al., 2020).

Além disso, foram observados resultados positivos de *Bacillus* spp. frente ao desempenho produtivo, imunidade intestinal, aumento de bactérias benéficas e na integridade do tecido epitelial do intestino de frangos acometidos por coccidiose (WANG et al., 2019; PARK et al., 2020; MEMON et al., 2021; MEMON et al., 2022).

Embasada nessas informações, a hipótese deste trabalho é de que os probióticos de *Bacillus* podem ser uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento em rações de frangos de corte, promovendo melhora no desempenho e na morfometria intestinal; e reduzindo lesões intestinais causadas por patógenos entéricos.

Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso de dois probióticos (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940; Ecobiol<sup>®</sup> e *Bacillus subtilis* DSM 32315; GutCare<sup>®</sup>) como alternativa ao antibiótico enramicina sobre o desempenho, rendimento de carcaça e cortes, morfometria e escore de lesão intestinal, parâmetros bioquímicos do sangue e concentração de ácidos graxos de cadeia curta em frangos de corte desafiados com *C. perfringens* e *Eimeria* vacinal.

## 2. REVISÃO

### 2.1 Enterite necrótica na avicultura

As exigências por carcaças livres de antibiótico predisuseram o ressurgimento de doenças, como a EN. Estima-se que esta enfermidade chega a causar perdas econômicas de 6 bilhões de dólares anualmente, no mundo (PAIVA; MCELROY, 2014; MWANGI et al., 2019).

A EN é uma enterotoxemia causada pela bactéria *Clostridium perfringens*, e seus sintomas são inespecíficos, como depressão, diarreia, penas eriçadas, anorexia e desidratação. É considerada uma doença multifatorial, predisposta por diversos fatores (ambiente, imunidade, nutrição, entre outros), causando alteração da mucosa intestinal e promovendo o desenvolvimento de necrose (PAIVA; MCELROY, 2014; BIAGINI et al., 2022).

Como a EN influencia diretamente na saúde intestinal da ave, deve-se estar atento a três fatores principais: a integridade das células epiteliais, a microbiota residente e o sistema imunológico (TOROK et al., 2011; FATHIMA et al., 2022b).

Um desequilíbrio na microbiota intestinal ocasionado por distúrbios entéricos pode impactar no desempenho e no rendimento da carcaça, visto a íntima relação entre a digestibilidade de nutrientes, energia metabolizável e deposição de proteína no músculo (BIAGINI et al., 2022; FATHIMA et al., 2022b).

Em frangos desafiados com *C. perfringens*, o muco secretado pelas células epiteliais do intestino é degradado por enzimas produzidas pelo patógeno, rompendo a barreira física que impedia sua adesão ao tecido, bem como promovendo uma fonte de nutrientes para seu crescimento e proliferação (TIMBERMONT et al., 2014; FATHIMA et al., 2022a). Adiciona-se a isso, a presença de *Eimeria* spp. pode exacerbar a produção de muco, tornando o ambiente favorável e acelerando a colonização do *C. perfringens* no epitélio intestinal (COLLIER et al., 2008; BORTOLUZZI et al., 2019). Ainda, as toxinas excretadas por *C. perfringens* invadem o epitélio, rompendo as junções entre as células adjacentes e espalhando-se pela lâmina basal, formando um biofilme que causa necrose e morte no tecido, o que caracteriza disbiose e aumento do processo inflamatório (VIDAL et al., 2015; ADHIKARI et al., 2020).

A EN ocorre normalmente entre a 2ª e a 6ª semana de vida da ave e pode apresentar-se de forma clínica ou subclínica. A EN clínica ou aguda normalmente causa a morte da ave antes mesmo do diagnóstico. Não apresenta sinais clínicos precoces ou evidentes, mas observa-se uma alta taxa de mortalidade nos lotes de frangos contaminados. As lesões macroscópicas da forma clínica (Figura 1a) se manifestam como uma necrose persistente por todo o intestino,

coberta por uma pseudomembrana amarelada ou manchada de bile (TIMBERMONT et al., 2011; KHALIQUE et al., 2020; BIAGINI et al., 2022).

A EN subclínica é a mais prevalente, não apresenta sinais clínicos aparentes ou causa morte eminente. Entretanto, as lesões na mucosa acarretam má digestão de nutrientes, com baixa produtividade, além de, ocasionalmente, promoverem lesões no fígado, o que aumenta a taxa de condenação do lote e gera grande perda econômica à indústria avícola. A forma subclínica é caracterizada pela presença de úlceras na forma de uma depressão e apresenta despigmentação amorfa na superfície da mucosa (Figura 1b) (TIMBERMONT et al., 2011; BIAGINI et al., 2022). Ademais, essas alterações anatopatológicas no trato gastrointestinal reduzem a diversidade microbiana e prejudicam a colonização de bactérias benéficas (ABASHT et al., 2016).

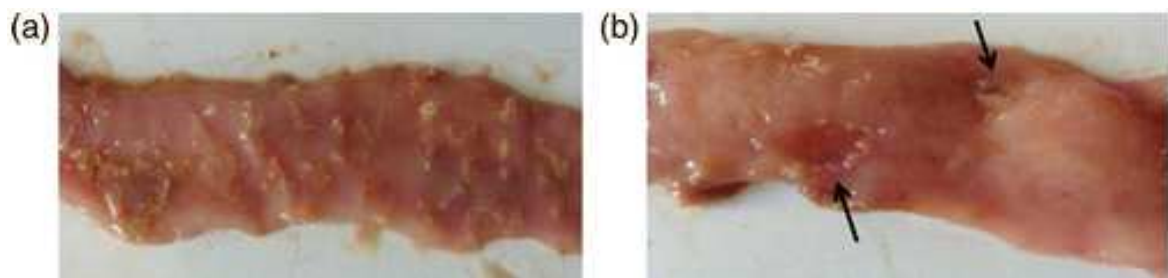


Figura 1. Lesões no intestino do frango. a) Enterite necrótica clínica; b) Enterite necrótica subclínica. FONTE: TIMBERMONT et al. (2011).

Assim sendo, compreender a importância da relação patógeno-hospedeiro e seu impacto na microbiota intestinal, desempenho e rendimento de carcaça em frangos de corte permite utilizar de estratégias preventivas, como probióticos para modular a saúde das aves.

Os probióticos melhoram a ingestão dos alimentos e a digestibilidade de nutrientes, o que influencia positivamente no desempenho, ganho de peso, rendimento de carcaça e cortes, melhorando a qualidade da carne sem qualquer efeito residual (FATHIMA et al., 2022b).

## 2.2 *Eimeria* spp. como fator predisponente para a enterite necrótica

Entre as enfermidades que acometem frangos de corte, a infecção por coccidiose representa um grande desafio, com perdas econômicas que ultrapassam 10 bilhões de dólares

anualmente, no mundo. Além disso, pode predispor outras doenças, como a EM, em aves (ADHIKARI et al., 2020; BLAKE et al., 2020).

A coccidiose é uma infecção causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Eimeria* pertencentes ao filo *Apicomplexa*, com mais de 1.000 espécies encontradas em diferentes hospedeiros: frango, pato, peru, gado, coelho, ovelha, cães e gatos (GYÖRKE et al., 2013; FATOBA e ADELEKE, 2018).

Em frangos, foram relatadas sete espécies (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. praecox* e *E. necatrix*) cada qual atuando em diferentes locais do intestino. Fator esse que, associado ao grau da lesão, determina a patogenicidade da doença (GYÖRKE et al., 2013; FATOBA e ADELEKE, 2018).

*E. tenella* e a *E. necatrix* estão localizadas no jejuno e ceco; são consideradas as mais patogênicas, causando diarreia sanguinolenta, além de alta morbidade e mortalidade nos frangos. *E. acervulina*, *E. brunetti* e *E. maxima* podem ser encontradas no duodeno, jejuno, íleo e reto; apresentam patogenicidade moderada a alta e causam edema da parede intestinal, manchas vermelhas e distensão do epitélio, o que predispõe o surgimento de outras doenças. *E. mitis* e *E. praecox* estão presentes normalmente no duodeno e jejuno; e, apesar da baixa patogenicidade, podem promover a má absorção dos nutrientes com consequente redução na taxa de crescimento (GYÖRKE et al., 2013; MESA-PINEDA et al., 2021; EL-SHALL et al., 2022).

Apesar das boas práticas de manejo sanitário nos aviários, a criação intensiva de frangos propicia um ambiente altamente contaminante por meio do contato com fezes, ração, poeira, água, cama e solo. Além do mais, a forma infectante de *Eimeria* spp. conhecida como oocisto esporulado pode sobreviver cerca de dois anos no ambiente, o que dificulta o controle da doença (GHAREKHANI et al., 2014; FATOBA e ADELEKE, 2018).

A infecção por coccidiose inicia-se pela ingestão de oocistos esporulados (infectantes), que, com a ação mecânica da moela e o contato com enzimas digestivas, sofrem ruptura e liberam os esporozoítos. Os esporozoítos invadem os enterócitos e formam os esquizontes, que posteriormente se rompem liberando os merozoítos. Os merozoítos invadem novos enterócitos e seguem se multiplicando, encerrando assim a fase assexuada (MESA-PINEDA et al., 2021; LEE et al., 2022).

Posteriormente, inicia-se a fase sexuada, em que os esquizontes penetram em novos enterócitos diferenciando-se em macrogametas (gametas femininos) e microgametas (gametas masculinos). Após a fecundação desses gametas, ocorre a formação dos oocistos imaturos que são liberados no lúmen intestinal e, então, excretados via fezes. O processo de esporulação dos

oocistos ocorre mediante as condições ótimas de temperatura, umidade e oxigênio no ambiente, para que, então, o ciclo recomece. O ciclo ocorre em um período curto, de 4 a 6 dias (MESA-PINEDA et al., 2021; LEE et al., 2022).

A principal patologia da infecção por *Eimeria* spp. é o extenso dano ao trato gastrointestinal dos frangos devido à rápida multiplicação no epitélio de revestimento, causando a destruição dos enterócitos, o que resulta em processos inflamatórios, elevada permeabilidade celular, extravasamento de nutrientes e proteínas no lúmen, hemorragia e o comprometimento da função de barreira do epitélio. Essas alterações levam à disbiose, ou seja, uma desordem na microbiota intestinal e à produção excessiva de mucina, o que favorece o aparecimento de patógenos oportunistas, como é o caso do *C. perfringens* causador de EN (PAIVA; MCELROY, 2014; ADHIKARI et al., 2020; MADLALA et al., 2021).

Todas essas alterações resultam em baixa absorção de nutrientes, com consequente alta na conversão alimentar e baixo ganho de peso. Além disso, clinicamente, pode-se observar a presença de diarreia mucoide ou sanguinolenta, desidratação, despigmentação de pele, prostração e infecções secundárias recorrentes (ADHIKARI et al., 2020; MADLALA et al., 2021).

Bortoluzzi et al. (2019) relataram que a infecção por *Eimeria* spp. isolada pode não ser suficiente para causar alterações significativas na microbiota intestinal, mas ainda assim pode impactar negativamente o desempenho dos frangos. Os autores ainda enfatizam que o mais preocupante são as coinfeções de *Eimeria* spp. e *C. perfringens*, que resultam em lesões graves no epitélio intestinal.

Por se tratar de um parasita onipresente e resistente a vários anticoccidianos, a prevenção é a melhor estratégia de controle. O desenvolvimento de vacinas é promissor, contudo, apresenta muitos efeitos colaterais, como baixo peso corporal associado a problemas de conversão alimentar. Desse modo, pesquisas com probióticos e fitoquímicos têm despertado o interesse dos pesquisadores na busca por alternativas preventivas que minimizem esses efeitos (BIAGINI et al., 2022).

### **2.3 Enterite necrótica por *Clostridium perfringens***

As bactérias do gênero *Clostridium* compreendem cerca de 180 espécies, sendo que grande parte delas é utilizada em aplicações biotecnológicas, como produção de enzimas, produtos químicos e biocombustíveis. Entretanto, algumas espécies são patogênicas e

produzem toxinas como, por exemplo, o *C. perfringens* causador de EN em frangos de corte (DÜRRE, 2014).

O *C. perfringens* é caracterizado como uma bactéria anaeróbia, gram-positiva e formadora de esporos. Quando comparado a outros anaeróbios, apresenta alta tolerância à presença de oxigênio e um tempo de geração de cerca de 10 minutos, considerado curto, o que permite a essa bactéria colonizar rapidamente o ambiente (GOHARI et al., 2021; ABD EL-HACK et al., 2022).

Essa habilidade de formar esporos possibilita que o *C. perfringens* se mantenha potencialmente infectante por longos períodos no ambiente, tornando essa cepa tolerante à temperatura, ao pH, à dessecação e à radiação. Acrescenta-se que tem alta adaptabilidade e pode crescer em faixas de temperatura que variam de 6°C a 50°C e pH no limiar de 5 a 9 (LI et al., 2016; FATHIMA et al., 2022a).

Essa bactéria é comumente encontrada na natureza (vegetação em decomposição, solo e fezes) e na microbiota intestinal de frangos saudáveis. Contudo, devido a sua alta patogenicidade e diversidade genética, pode causar uma série de infecções histotóxicas, enterites, danos ao fígado e aos rins, dermatite e gangrena gasosa. Logo, a caracterização genética, a compreensão dos toxinótipos e o perfil de resistência a antimicrobianos de diferentes isolados de *C. perfringens* permitem melhores esclarecimentos acerca da EN (GHARIB-NASERI et al., 2019; MWANGI et al., 2019).

A patogenicidade das cepas de *C. perfringens* é determinada por mais de 20 tipos de toxinas identificadas até o momento, estas que têm como principal função a produção de enzimas que destruam a membrana das células, as toxinas formadoras de poros celulares, as toxinas intracelulares e as enzimas que hidrolisem moléculas. Por conta de sua variedade, a partir de um sistema de tipagem da toxina, é possível classificar essa cepa em sete tipos: A, B, C, D, E, F e G (Tabela 1) (KIU e HALL, 2018; ABD EL-HACK et al., 2022).

Os *C. perfringens* A, C e G estão relacionados a doenças aviárias, em especial à EN. Mais recentemente, foi demonstrado que a toxina NetB – presente em *C. perfringens* G - tem relação direta com o desenvolvimento de EN, sendo observado que a maioria das cepas isoladas que produzem a toxina são responsáveis por causar a doença. Em contrapartida, nas aves saudáveis, não se observa sua presença (KIU e HALL, 2018; ABD EL-HACK et al., 2022).

A NetB atua por meio da formação de poros que leva à ruptura da membrana plasmática com o aumento no influxo de íons nas células, o que, eventualmente, leva à maior permeabilidade, causando lise e morte celular (FATHIMA et al., 2022a).



Tabela 1. Correlação entre os tipos de *C. perfringens* e sua patogenicidade.

Tipo de <i>Clostridium</i>	Gene codificante	Patogenicidade
A	Toxina alfa	Gangrena gasosa em humanos e outros animais, enterotoxemia em ruminantes, equinos e suínos, enterite necrótica em aves e gastroenterite hemorrágica em cães e cavalos.
B	Toxina alfa, beta e épsilon	Disenteria em cordeiro.
C	Toxina alfa, beta e CPE	Enterite hemorrágica e necrose de animais neonatos, enterite necrótica em aves humanos.
D	Toxina alfa, épsilon e CPE	Enterotoxemia em ovinos, caprinos e bovinos, e enterocolite em caprinos.
E	Toxina alfa, iota e CPE	Gastroenterite de bovinos e coelhos.
F	Toxina alfa e CPE	Intoxicação alimentar, diarreia associada a antibióticos e diarreia esporádica em humanos.
G	Toxina alfa e NetB	Enterite necrótica em aves.

FONTE: adaptado de GOHARI et al. (2021) e ABD EL-HACK et al. (2022).

Apesar de o principal agente de enterite necrótica ser a cepa de *C. perfringens*, este é considerado um patógeno oportunista em aves, o que indica que a forma clínica da doença está ligada também a outros fatores como coccidiose, redução na qualidade da ração ou presença de doenças imunossupressoras (BIAGINI et al., 2022).

Perante o inerente impacto econômico e sanitário frente a doenças entéricas, no setor avícola, estudos com probióticos têm se mostrado promissores em reduzir o impacto negativo dessas infecções no desempenho e saúde intestinal de frangos de corte, bem como prover uma alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento (RAMLUCKEN et al., 2020; KULKARNI et al., 2022).

#### 2.4 Uso de antibióticos e suas proibições

Desde 1950, os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento na avicultura, ou seja, são adicionados à ração em níveis subterapêuticos como método profilático. O objetivo é reduzir a incidência de doenças, atuando diretamente na redução de bactérias oportunistas da microbiota intestinal, o que conseqüentemente melhora a digestibilidade de

nutrientes e aumenta o desempenho zootécnico das aves comerciais (GADDE et al., 2017a; ABD EL-HACK et al., 2022).

De forma abrangente, o uso de antibióticos em doses subterapêuticas trouxe muitos benefícios à produção avícola: reduziu a incidência de doenças subclínicas, reduziu a morbidade e mortalidade, reduziu os custos de alimentação e aumentou a taxa de crescimento com maior aproveitamento dos nutrientes da ração (GADDE et al., 2017a; RAHMAN et al., 2022).

Acredita-se que o modo de ação dos antibióticos como promotores de crescimento está relacionado ao controle populacional de bactérias residentes da microbiota intestinal. Sua presença reduz a população e a diversidade microbiana e inibe citocinas pró-inflamatórias, assim, conseqüentemente, diminui a competição por nutrientes e metabólitos, mantendo o equilíbrio microbiano, o que permite ao animal expressar seu potencial genético (GADDE et al., 2017a; RAHMAN et al., 2022).

Drogas antibacterianas como bacitracina, avilamicina, virginamicina e enramicina foram comumente usadas para tratamento e prevenção de doenças entéricas em frangos de corte. Porém, a utilização desses antibióticos de forma ambígua contribuiu para a disseminação de genes bacterianos resistentes, que têm como característica a adaptabilidade a múltiplos hospedeiros, com diversos mecanismos de virulência e troca de material genético entre espécies (FOUNOU et al., 2016; ABD EL-HACK et al., 2022; CHEN e YU, 2022).

Dados recentes comprovam que mais de 700 mil pessoas morrem anualmente no mundo por infecções causadas por bactérias multirresistentes. E estima-se que, sem medidas de controle, até 2050, esse número chegue a 10 milhões de mortes (RAHMAN et al., 2022).

Em vista do surgimento de bactérias multirresistentes na saúde humana, investigações confirmaram que a produção animal se tornou um reservatório dessas cepas. Recentemente, entende-se que mais de 60% das doenças humanas são de origem zoonótica e que 75% das infecções emergentes em humanos são oriundas dos animais (ABD EL-HACK et al., 2022; RAHMAN et al., 2022).

Dada a íntima relação do homem com o ambiente, a transmissão de cepas resistentes pode ocorrer de várias formas: indiretamente por meio do consumo de alimentos contaminados, por contato direto com animais colonizados ou mesmo substâncias biológicas (sangue, urina, fezes, saliva, sêmen, entre outros) (FOUNOU et al., 2016). Assim, o uso indiscriminado de antibióticos causa uma pressão de seleção de cepas multirresistentes que podem transferir esse gene para bactérias ambientais ou mesmo para a microbiota humana e animal, agravando o problema de resistência microbiana (RAHMAN et al., 2022).

Essas preocupações impulsionaram vários países a limitar o uso de antibióticos reconhecidamente importantes na saúde humana como promotores de crescimento em animais de produção (Tabela 2) (ABD EL-HACK et al., 2022; BIAGINI et al., 2022; RAHMAN et al., 2022).

Tabela 2. Regulamentações sobre o uso de antibióticos como promotores de crescimento em diferentes países

Suécia	1986	Primeiro país a banir o uso de antibióticos como promotores de crescimento.
União Europeia	2006	Ilegal em toda a União Europeia. Somente as fluoroquinolonas continuam a ser licenciadas no Reino Unido e em alguns países da União Europeia. Proibida a importação de carne e laticínios produzidos com antibióticos promotores de crescimento.
Brasil	1998	Em 1998, proibiu o uso do cloranfenicol, penicilinas, tetraciclina, sulfonamidas sistêmicas e avoparcina; em 2004, olaquinox; em 2005, do carbadox; em 2009, quinolonas e demais anfenicóis e beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas); em 2012, a eritromicina e espiramicina; em 2016, a colistina; e, em 2020, tilosina, lincomicina e tiamulina.
Estados Unidos	2017	Antimicrobianos clinicamente importantes para a saúde humana são proibidos.
Austrália	2017	Antibióticos usados na medicina humana não são permitidos como promotores de crescimento. Somente cinco antibióticos (olaquinox, avilamicina, bambemicina, monensina e salinomicina) não usados atualmente na medicina humana são usuais como promotores de crescimento em aves, suínos, bovinos e ovinos.
Nova Zelândia	2017	Os antibióticos não foram banidos, apenas regulamentados pelo Ministério da Saúde e o Ministério das Indústrias Primárias para que não deixem resíduos acima do nível máximo permitido nos alimentos dos animais tratados. Em comparação com os países da União Europeia, a Nova Zelândia usa mais cefalosporinas e macrolídeos, mas menos quinolonas.
Canadá	2020	Algumas categorias do antimicrobiano medicamento importantes não foram permitidas para uso como promotores de crescimento. Os produtos ionóforos e coccidiostáticos não foram afetados.
China	2020	Todos os promotores de crescimento de antibióticos, exceto fitoterápicos, foram proibidos.

FONTE: adaptado BEZERRA et al. (2017), REPIK et al. (2022) e RAHMAN et al. (2022).

Neste cenário, surgiu - em 2015 - o Plano de Ação Global contra resistência antimicrobiana. Esse Plano de Ação Global é uma ação conjunta entre a Organização Mundial

de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A partir dessa ação, foram desenvolvidos cinco objetivos para o combate à resistência microbiana (WHO, 2015):

1. Apoiar a conscientização e a melhor compreensão da resistência antimicrobiana por meio de comunicação, educação e treinamento eficazes;
2. Construir embasamento científico para fortalecer o conhecimento e buscar evidências por meio de vigilância;
3. Reduzir a incidência de doenças infecciosas;
4. Otimizar o uso racional de medicamentos antimicrobianos;
5. Mobilizar recursos que justifiquem investimentos sustentáveis para o desenvolvimento de ferramentas e estratégias com objetivo de conter e/ou prevenir a disseminação de cepas resistentes.

A OMS formulou diretrizes para o uso adequado e controlado de medicamentos na saúde humana e animal. Apesar de liberado, o uso de antibióticos para tratamento de doenças clínicas em aviários, todavia, as diretrizes vêm acompanhadas de orientações rigorosas de aplicação, dosagem e acompanhamento de profissionais qualificados com o intuito de reduzir o impacto da resistência microbiana. Além disso, sugere-se evitar a rotatividade ou o uso de coquetéis de antibióticos em aviários durante um mesmo ciclo de produção, para reduzir a resistência a múltiplos medicamentos (JIBRIL et al., 2021; RAHMAN et al., 2022; XU et al., 2022).

O Brasil, como membro da OMS, instituiu, em 2018, o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR) com o objetivo multidisciplinar de desenvolver estratégias e medidas preventivas que assegurem o uso responsável de antibióticos e controle a disseminação de bactérias resistentes (BRASIL, 2019). Dentro do conceito de saúde única, foi criado o Programa de Vigilância e Monitoramento de Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária (AgroPrevine) a partir da Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 41, de 23 de outubro de 2017, com o objetivo de prevenir, diagnosticar e controlar a resistência aos antimicrobianos na agropecuária (BRASIL, 2017).

Apesar do PAN-BR ter surgido somente em 2018, desde 1998 já havia restrições no uso de antibióticos como promotores de crescimento. Atualmente, no Brasil, são proibidas as seguintes substâncias antimicrobianas com função de melhorador de desempenho: avoparcina, cloranfenicol, nitrofuranos, anfenicóis, tetraciclina, penicilinas, cefalosporinas, quinolonas,

sulfonamidas, eritromicina, espiramicina, colistina, e mais recentemente, tilosina, lincomicina e tiamulina (REPIK et al., 2022).

Com essas regulamentações perante o novo cenário preocupante da resistência bacteriana, associado a novas diretrizes para exportação e à preferência dos consumidores por carne de frango sem resíduos, a indústria tem buscado estratégias que substituam os antibióticos usuais. Em vista disso, as pesquisas se voltaram ao uso de bioativos naturais como os extratos de plantas, óleos essenciais, prebióticos, probióticos e enzimas, com o objetivo de desenvolver produtos para prevenção de doenças de importância econômica no setor avícola (GADDE et al., 2017a; AYALEW et al., 2022).

## 2.5 Probióticos

Com a adequação de políticas públicas que restringem o uso de antibióticos como promotores de crescimento na avicultura, surge uma predileção por bioativos naturais com o intuito de encontrar compostos que melhorem o desempenho e a conversão alimentar em aves, bem como detenham infecções por patógenos. Com isso, o uso de probióticos em frangos de corte é uma opção viável, visto sua comprovada segurança alimentar, além de não deixar resíduos na carne ou no ambiente (HERNANDEZ-PATLAN et al., 2019; AYALEW et al., 2022; BIAGINI et al., 2022).

Segundo a Instrução Normativa do MAPA nº 13, de 30 de novembro de 2004, que regulamenta o uso de aditivos destinados à alimentação animal, os probióticos são definidos como “cepas de microrganismos vivos (viáveis), que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestivo dos animais, contribuindo para o seu equilíbrio” (BRASIL, 2004).

Ainda, como existe uma ampla variedade de microrganismos utilizados como probióticos, estes podem ser classificados conforme sua composição e origem (BAJAGAI et al., 2016):

- Probióticos bacterianos e não bacterianos: destacam-se alguns fungos e leveduras dos gêneros *Saccharomyces* spp. e *Aspergillus* spp., mas a maioria dos probióticos são formados por bactérias, principalmente os gêneros: *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp.
- Probióticos formadores e não formadores de esporos: alguns gêneros de bactérias podem estar na forma esporulada, assim, sobrevivendo a situações adversas em seu

desenvolvimento. Dentro desse grupo, podemos citar os *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*.

- Probióticos multiespécies e probióticos de única espécie: são produtos comerciais compostos por uma única espécie ou pela associação de diferentes bactérias.
- Probióticos autóctones ou alóctones: os agentes que fazem parte do trato gastrointestinal da espécie hospedeira são chamados de autóctones (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e os agentes que não são nativos do trato gastrointestinal são chamados de alóctones (leveduras).

Atualmente, o uso de probióticos na indústria tem crescido exponencialmente e estima-se que até 2025 o setor movimente cerca de 77 bilhões de dólares (BARAL et al., 2021). No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa do MAPA nº 13, de 30 de novembro de 2004, os probióticos são classificados como aditivos zootécnicos que equilibram a microbiota intestinal com efeito benéfico sobre a saúde intestinal. Suas diretrizes de formulação seguem a mesma normativa rigorosa que a produção de qualquer outro aditivo zootécnico (BRASIL, 2004).

A produção dos probióticos se dá pela fermentação de culturas bacterianas selecionadas e os produtos são usados para suplementar a alimentação dos animais, ou mesmo para a fabricação de produtos biológicos, cosméticos ou medicamentos. Sua formulação deve apresentar propriedades desejáveis, como estabilidade para produção em larga escala e para estocagem, podendo conter componentes como termoprotetores e crioprotetores para preservar e até melhorar o desempenho e a viabilidade até o momento do uso (KOUHOUNDE et al., 2022; AYALEW et al., 2022).

Por se tratar de microrganismos vivos, as formulações de probióticos apresentam alguns embates e, portanto, para sua confecção, a seleção e a caracterização dos microrganismos deve ser pensada levando em conta a adaptabilidade e os mecanismos de ação da cepa, evitando microrganismos suscetíveis à resistência ou que produzem toxinas. A finalidade é promover estabilidade para o composto sem perder sua característica biológica e aplicabilidade terapêutica (BARAL et al., 2021; AYALEW et al., 2022).

As formulações probióticas via ração são as mais comuns, devido à facilidade de utilização, ao baixo risco de infecção e ao custo-benefício. Todavia, a administração oral também influencia no desempenho do produto, pois, na medida que passa pelo trato gastrointestinal, entra em contato com os fluidos gástricos do estômago, com os sais biliares e com outras enzimas digestivas presentes no intestino delgado, e, de tal modo, devem ter como característica a resistência a essas condições adversas (BARAL et al., 2021).

Os probióticos têm como principal função estabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal e podem ser utilizados como adjuvantes terapêuticos para prevenção de doenças, como a EN em frangos de corte (BARAL et al., 2021; AYALEW et al., 2022). Os principais grupos de microrganismos utilizados como probióticos são as bactérias ácido lácticas, como os *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.; bactérias ambientais como os *Bacillus* spp.; e as leveduras como *Saccharomyces* spp. (KOUHOUNDE et al., 2022; AYALEW et al., 2022). Por se tratar de uma grande diversidade de espécies microbianas utilizadas para preparação dos probióticos, estes apresentam vários mecanismos de ação:

- Exclusão competitiva: por meio da qual se aderem aos sítios de ligação presentes no epitélio intestinal, aumentando a quantidade de bactérias benéficas e, com isso, conseguem vantagem na captação de nutrientes frente a patógenos (KOUHOUNDE et al., 2022; AYALEW et al. 2022).
- Antagonismo direto: pela produção de substâncias antibacterianas (bacteriocinas, enzimas e compostos antioxidantes), que agem liberando ácidos graxos de cadeia curta e ácidos orgânicos no intestino, reduzindo o pH e suprimindo, assim, a colonização de patógenos (KOUHOUNDE et al., 2022; AYALEW et al. 2022).
- Alteração na expressão genética: os probióticos agem inibindo a comunicação química (*quorum sensing*) entre as bactérias, o que conseqüentemente diminui a patogenicidade ou virulência das cepas patogênicas (BAJAGAI et al., 2016).
- Estimulação do sistema imunológico: atuando como moduladores de imunidade, favorecendo a formação de compostos benéficos, equilibrando a microbiota intestinal, estimulando a atividade fagocitária, modulando positivamente citocinas pró e anti-inflamatórias e aumentando a produção de imunoglobulinas (KOUHOUNDE et al., 2022; AYALEW et al., 2022).

Isto posto, estudos voltados à enterite necrótica em frangos de corte têm demonstrado que o uso de probióticos trouxe benefícios, melhorando a absorção de nutrientes (HOSSAIN et al., 2015), a conversão alimentar, o desempenho zootécnico (HOSSAIN et al., 2015; RATHNAPRABA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019), a modulação imunológica (GADDE et al., 2017b) e protegendo a integridade do epitélio intestinal (HOSSAIN et al., 2015; GADDE et al., 2017b; AYALEW et al., 2022).

As pesquisas também se voltaram ao impacto dos probióticos no controle de *Eimeria* spp. em frangos de corte, demonstrando eficácia em reduzir o escore de lesão intestinal e a



excreção de oocistos, bem como melhorando o desempenho zootécnico das aves (GIANNENAS et al., 2012; PARK et al., 2020; BIAGINI et al., 2022).

Outro estudo de Ritzi et al. (2016) demonstrou que a associação de probióticos com uma vacina para *Eimeria* spp. reduziu os efeitos colaterais da vacina, mantendo sua eficiência e melhorando a resposta imune, com efeito protetor adicional à coccidiose. Segundo Madlala et al. (2021), os efeitos benéficos das bactérias probióticas se devem à sua aderência ao epitélio intestinal, reduzindo, desta forma, a área de superfície disponível para a colonização de *Eimeria* spp., o que promove melhora na homeostase da microbiota intestinal e evita danos ao epitélio (MADLALA et al., 2021).

## 2.6 Probióticos de *Bacillus* spp.

Atualmente, muitas espécies bacterianas são estudadas para uso como probióticos na produção animal. Contudo, normalmente os probióticos são orais e devem ser formulados para passar pelo trato gastrointestinal sem perder sua atividade metabólica (LUISE et al., 2022).

Destarte, surgiu o interesse pelas cepas de *Bacillus* spp., por se tratar de bactérias esporuladas que são naturalmente resilientes aos processamentos industriais e digestivos, sendo uma ótima opção de uso na nutrição animal (BERNARDEAU et al., 2017). Adiciona-se, ainda, que essas bactérias têm a capacidade de produzir moléculas antimicrobianas e possuem tolerância a mudanças ambientais abruptas (como mudanças de temperatura, pressão, radiação ultravioleta, ativos químicos e físicos, umidade do ar e pH), o que favorece sua produção e manipulação em larga escala (ELISASHVILI et al., 2019; LUISE et al., 2022).

Os *Bacillus* spp. são bactérias gram-positivas, em formato de bastonete, formadoras de esporos e podem ser completamente aeróbias ou aeróbias facultativas. Apresentam-se em duas formas, como células vegetativas com metabolismo ativo e na forma de esporos, os quais provêm resistência a condições ambientais estressantes (BERNARDEAU et al., 2017). São encontradas no solo, água, ar, alimentos e trato gastrointestinal de animais. As principais espécies de interesse para confecção de probióticos são: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaeciens*, *B. velezensis* e *B. cereus* (GHELARDI et al., 2022; LUISE et al., 2022).

Quando o animal ingere os esporos de *Bacillus* spp., estes se mantêm resistentes às condições ácidas do estômago, e a presença de baixo pH nesse local torna-se um fator ideal para iniciar o processo de germinação. Após a germinação e a chegada ao intestino delgado,

que é rico em nutrientes, a cepa começa a colonizar exponencialmente o local. Caso não germinem antes de chegar ao intestino, esses esporos podem sofrer a ação de enzimas digestivas saindo da fase estacionária e formando as células vegetativas que atuam liberando metabólitos secundários bioativos no lúmen intestinal (BERNARDEAU et al., 2017).

Os metabólitos secretados pelos *Bacillus* spp. de importância probiótica são: os compostos antimicrobianos (como bacteriocinas), os antibióticos (como surfactinas) e enzimas extracelulares que degradam carboidratos, lipídios e proteínas e auxiliam na digestão dos nutrientes (BERNARDEAU et al., 2017; LUISE et al., 2022).

No mercado, encontramos várias cepas que são utilizadas como probióticos, o *B. subtilis* comumente encontrado no solo vem se destacando entre elas e tem sido utilizado em várias espécies como aditivo alimentar (VLAMAKIS et al., 2013). Essa bactéria não é nativa da microbiota intestinal, na maioria das vezes, apenas transita pelo intestino com o conteúdo intestinal, e sua presença pode dificultar a adesão de microrganismos patogênicos, por exclusão competitiva ou antagonismo (SUN et al., 2010; BERNARDEAU et al., 2017).

Jiang et al. (2022), em estudos comportamentais, demonstraram o benefício de *B. subtilis* em reduzir o comportamento agressivo das aves, pela produção de triptofano que atua como agente antidepressivo. Petchkongkaew et al. (2008) e Fan et al. (2013) demonstraram que *B. subtilis* apresentou efeito protetor frente a desafios alimentares como aflatoxina em frangos de corte, melhorando o desempenho zootécnico, a qualidade da carne e reduzindo os resíduos tóxicos no fígado.

O *B. subtilis* também diminuiu a produção de amônia, toxinas e aminas, atuando na microbiota intestinal das aves e selecionando algumas classes de bactérias capazes de reduzir a emissão de amônia, melhorando a atividade enzimática e a utilização de nitrogênio (ZHANG et al., 2013).

Jayaraman et al. (2013) encontraram resultados positivos para morfometria intestinal, com redução no escore de lesão e na proliferação de *C. perfringens* em frangos de corte suplementados com *B. subtilis*, demonstrando que o uso do probiótico melhorou a saúde intestinal em frangos de corte com EN.

Outra cepa de interesse é o *B. amyloliquefaciens*, que age promovendo a hidrólise do amido e a fermentação de carboidratos (glicose, sacarose e lactose) com a produção de gás e redução de nitrato a nitrito (AHMED et al., 2014; SUPRIYATI et al., 2015).

Oliveira et al. (2019) relataram a importância da espécie *B. amyloliquefaciens* na produção de substâncias antimicrobianas, que são citotóxicas para diversos microrganismos patogênicos, principalmente para *Eimeria* spp. e o *Clostridium* spp., patógenos que acarretam

doenças entéricas de relevância sanitária na avicultura brasileira. Os autores também observaram que os frangos de corte suplementados tiveram melhora na conversão alimentar, uniformidade do lote, rendimento de carcaça e rendimento de peito.

Ao avaliar as propriedades de *B. amyloliquefaciens*, Farhat-Khenakhem et al. (2018) demonstraram que a cepa apresentou tolerância a condições severas de pH no trato digestório, maior adesão aos enterócitos e secreção de enzimas (fitase, amilase, xilanase e  $\beta$ -glucanase) importantes para neutralizar fatores antinutricionais da ração, considerando um excelente probiótico para uso na suplementação alimentar de aves.

Hussein et al. (2020) avaliaram probióticos de *Bacillus* spp. em frangos de corte desafiado com *C. perfringens* e observaram melhora no desempenho, modulação intestinal, eficiência alimentar, qualidade da carne, características de carcaça e baixa mortalidade, sugerindo o uso desses probióticos em substituição a antibióticos comumente utilizados na avicultura.

Nesse contexto, os probióticos à base de cepas de *Bacillus* spp. são uma excelente alternativa de uso na alimentação de frangos de corte, melhorando o desempenho e a saúde intestinal. Ressalta-se, contudo, a necessidade de maiores informações frente aos mecanismos de ação que envolvem essas cepas.

## 2.7 Referências

- ABASHT, B.; MUTRYN, M.F.; MICHALEK, R.D. et al. Oxidative stress and metabolic perturbations in wooden breast disorder in chickens. **PloS one**, v.11, n.4, p. e0153750, 2016.
- ABD EL-HACK, M.E.; EL-SAADONY, M.T.; ELBESTAWY, A.R. et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives - a comprehensive review. **Poultry science**, v.101., n.2, p.101590, 2022.
- ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2022**. Disponível em:<<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-vf.pdf>> Acesso em: 06 nov. 2022.
- ADHIKARI, P.; KIESS, A.; ADHIKARI, R. et al. An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. **Journal of applied poultry research**, v.29, n.2, p.515-534, 2020.
- AHMED, S.T.; ISLAM, M.; MUN, H.S. et al. Effects os *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora anda fecal noxious gas emissions of broiler checkens. **Poultry Science**, v.93, p.1963-1971, 2014.

- AYALEW, H., ZHANG, H., WANG, J. et al. Potential feed additives as antibiotic alternatives in broiler production. **Frontiers in Veterinary Science**, v.9, p.1-15, 2022.
- BAJAGAI, Y.S.; KLIEVE, A.V.; DART, P.J. et al. **Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation**. Roma: World Health Organization (WHO), 2016. 108p.
- BARAL, K.C.; BAJRACHARYA, R.; LEE, S.H. et al. Advancements in the pharmaceutical applications of probiotics: dosage forms and formulation technology. **International Journal of Nanomedicine**, v.16, p.7535–7556, 2021.
- BARBUT, S. **The science of poultry and meat processing**. Canada: University of Guelph, 2015. 734p.
- BERNARDEAU, M.; LEHTINEN, M.J.; FORSSTEN, S.D. et al. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal of Food Science and Technology**, v.54, n.8, p.2570-2584, 2017.
- BEZERRA, W.G.A.; HORN, R.H., SILVA, I.N.G., et al. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.
- BIAGINI, L.; GALOSI, L.; RONCARATI, A. et al. The role of nutraceuticals and phytonutrients in chickens' gastrointestinal diseases. **Animals**, v.12, n.7, p.1-21, 2022.
- BLAKE, D.P.; KNOX, J.; DEHAECK, B. et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. **Veterinary Research**, v.51, n.1, p.1-14, 2020.
- BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B.S.; HOFACRE, C. et al. Effect of different challenge models to induce necrotic enteritis on the growth performance and intestinal microbiota of broiler chickens. **Poultry Science**, v.98, n.7, p.2800-2812, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa Nº 13, de 30 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União. Brasília: MAPA, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa n. 41, de 23 de outubro de 2017. Institui o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária - AgroPrevine. Diário Oficial da União. Brasília: MAPA, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR). Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- CHEN, H.L.; ZHAO, X.Y.; ZHAO, G.X. et al. Dissection of the cecal microbial community in chickens after *Eimeria tenella* infection. **Parasites & Vectors**, v.13, n.1, p.1-15, 2020.
- COLLIER, C.T.; HOFACRE, C.L.; PAYNE, A.M. et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.122, n.1-2, p.104-115, 2008.
- DIAZ-SANCHEZ, S.; HANNING, I.; PENDLETON, S. et al. Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety. **Poultry Science**, v.92, n.2, p.562-572, 2013.

- DÜRRE, P. Physiology and sporulation in *Clostridium*. **Microbiology Spectrum**, v.2, n.4, p.1-14, 2014.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; CHIKINDAS, M.L. Recent advances in the physiology of spore formation for *Bacillus* probiotic production. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.11, n.3, p.731-747, 2019.
- EL-SHALL, N.A.; ABD EL-HACK, M.E.; ALBAQAMI, N.M. et al. Phytochemical control of poultry coccidiosis: a review. **Poultry Science**, v.101, n.1, p.1-22, 2022.
- FAN Y.; ZHAO, L.; MA, Q. et al. Effects of *Bacillus subtilis* ANSB060 on growth performance, meat quality and aflatoxin residues in broilers fed moldy peanut meal naturally contaminated with aflatoxins. **Food and Chemical Toxicology**, v.59, p.748-753, 2013.
- FARHAT-KHENAKHEM, A.; BLIBECH, M.; BOUKHRIS, I. et al. Assessment of the potential of the multi-enzyme producer *Bacillus amyloliquefaciens* US573 as alternative feed additive. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.98, n.3, p.1208-1215, 2018.
- FATHIMA, S.; HAKEEM, W.; SHANMUGASUNDARAM, R. et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: a review on the pathogen, pathogenesis, and prevention. **Microorganisms**, v.10, n.10, p.1-31, 2022a.
- FATHIMA, S.; SHANMUGASUNDARAM, R.; ADAMS, D. et al. Gastrointestinal microbiota and their manipulation for improved growth and performance in chickens. **Foods**, v.11, n.10, p.1-30, 2022b.
- FATOBA, A.J.; ADELEKE, M.A. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. **Journal of Parasitic Diseases**, v.42, n.4, p.483-493, 2018.
- FOUNOU, L.L.; FOUNOU, R.C.; ESSACK, S.Y. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1-19, 2016.
- GADDE, U.; KIM, W.; OH, S.T. et al. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. **Animal Health Research Reviews**, v.18, n.1, p.26-45, 2017a.
- GADDE, U.; OH, S.T.; LEE, Y.S. et al. The effects of direct-fed microbial supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immune status, and epithelial barrier gene expression in broiler chickens. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v.9, n.4, p.397-405, 2017b.
- GHAREKHANI, J.; SADEGHI-DEHKORDI, Z.; BAHRAMI, M. Prevalence of coccidiosis in broiler chicken farms in western Iran. **Journal of Veterinary Medicine**, v.2014, p.980604, 2014.
- GHARIB-NASERI, K.; KHERAVII, S.K.; KEERQIN, C. et al. Two different *Clostridium perfringens* strains produce different levels of necrotic enteritis in broiler chickens. **Poultry science**, v.98, n.12, p.6422-6432, 2019.
- GHELARDI, E.; ABREU Y ABREU, A.T.; MARZET, C.B. et al. Current progress and future perspectives on the use of *Bacillus clausii*. **Microorganisms**, v.10, n.6, p.1246, 2022.
- GIANNENAS, I.; PAPADOPOULOS, E.; TSALIE, E. et al. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of

- chickens infected with *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v.188, n.1-2, p.31–40, 2012.
- GOHARI, I.M.; NAVARRO, M.A.; LI, J. et al. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. **Virulence**, v.12, n.1, p.723–753, 2021.
- GYÖRKE, A.; POP, L.; COZMA, V. Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities. **Parasite**, v.20, n.50, p.1-8, 2013.
- HERNANDEZ-PATLAN, D.; SOLIS-CRUZ, B.; PONTIN, K.P. et al. Impact of a *Bacillus* direct-fed microbial on growth performance, intestinal barrier integrity, necrotic enteritis lesions, and ileal microbiota in broiler chickens using a laboratory challenge model. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, p.1-11, 2019.
- HOSSAIN, M.M.; BEGUM, M.; KIM, I.H. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. **Veterinarni Medicina**, v.60, n.2, p.77-86, 2015.
- HUSSEIN, E.; AHMED, S.H.; ABUDABOS, A.M. et al. Ameliorative effects of antibiotic-, probiotic- and phytobiotic-supplemented diets on the performance, intestinal health, carcass traits, and meat quality of *Clostridium perfringens*-infected broilers. **Animals**, v.10, n.4, p.1-14, 2020.
- JAYARAMAN, S.; THANGAVEL, G.; KURIAN, H. et al. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. **Poultry Science**, v.92, n.2, p.370–374, 2013.
- JHA, R.; DAS, R.; OAK, S. et al. Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: a systematic review. **Animals**, v.10, n.10, p.1-18, 2020.
- JIANG, S.; HU, J.Y.; CHENG, H.W. The impact of probiotic *Bacillus subtilis* on injurious behavior in laying hens. **Animals**, v.12, n.7, p.1-20, 2022.
- JIBRIL, A.H.; OKEKE, I.N.; DALSGAARD, A. et al. Association between antimicrobial usage and resistance in *Salmonella* from poultry farms in Nigeria. **BMC veterinary research**, v.17, n.1, p.1-10, 2021.
- KHALIQUE, A.; ZENG, D.; SHOAI, M. et al. Probiotics mitigating subclinical necrotic enteritis (SNE) as potential alternatives to antibiotics in poultry. **AMB Express**, v.10, n.1, p.1-10, 2020.
- KIU, R.; HALL, L.J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. **Emerging Microbes & Infections**, v.7, n.1, p.1-15, 2018.
- KOUHOUNDE, S.; ADÉOTI, K.; MOUNIR, M. et al. Applications of probiotic-based multi-components to human, animal and ecosystem health: concepts, methodologies, and action mechanisms. **Microorganisms**, v.10, n.9, p.1-31, 2022.
- KRYSIAK, K.; KONKOL, D.; KORCZYŃSKI, M. Overview of the use of probiotics in poultry production. **Animals**, v.11, n.6, p.1-24, 2021.
- KULKARNI, R.R.; GAGHAN, C.; GORRELL, K. et al. Probiotics as alternatives to antibiotics for the prevention and control of necrotic enteritis in chickens. **Pathogens**, v.11, n.6, p.1-20, 2022.

- LEE, Y.; LU, M.; LILLEHOJ, H.S. Coccidiosis: recent progress in host immunity and alternatives to antibiotic strategies. **Vaccines**, v.10, n.2, p.1-25, 2022.
- LI, J.; PAREDES-SABJA, D.; SARKER, M. R. et al. *Clostridium perfringens* sporulation and sporulation-associated toxin production. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.3, p.1-16, 2016.
- LUISE, D.; BOSI, P.; RAFF, L. et al. *Bacillus* spp. probiotic strains as a potential tool for limiting the use of antibiotics, and improving the growth and health of pigs and chickens. **Frontiers in Microbiology**, v.13, p.1-19, 2022.
- MADLALA, T.; OKPEKU, M.; ADELEKE, M.A. Understanding the interactions between *Eimeria* infection and gut microbiota, towards the control of chicken coccidiosis: a review. **Parasite**, v.28, n.48, p.1-10, 2021.
- MARCU, A.; DUMITRESCU, G.; LAVINIA, Ş. et al. The influence of nutrition, sex and slaughter age on characteristics of pectoralis major muscle at broiler chickens Ross-308. **Animal Science & Biotechnologies**, v.47, n.1, p.306-312, 2014.
- MEMON, F.U.; YANG, Y.; LEGHARI, I.H. et al. Transcriptome analysis revealed ameliorative effects of *Bacillus* based probiotic on immunity, gut barrier system, and metabolism of chicken under an experimentally induced *Eimeria tenella* infection. **Genes**, v.12, n.4, p.1-14, 2021.
- MEMON, F.U.; YANG, Y.; ZHANG, G. et al. Chicken gut microbiota responses to dietary *Bacillus subtilis* probiotic in the presence and absence of *Eimeria* infection. **Microorganisms**, v.10, n.8, p.1-15, 2022.
- MESA-PINEDA, C.; NAVARRO-RUIZ, J.L.; LÓPEZ-OSORIO, S. et al. Chicken coccidiosis: from the parasite lifecycle to control of the disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, p.1-15, 2021.
- M'SADEQ, S.A.; WU, S.; SWICK, R.A. et al. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. **Animal Nutrition**, v.1, n.1, p.1-11, 2015.
- MWANGI, S.; TIMMONS, J.; FITZ-COY, S. et al. Characterization of *Clostridium perfringens* recovered from broiler chicken affected by necrotic enteritis. **Poultry Science**, v.98, n.1, p.128-135, 2019.
- OLIVEIRA, M.J.K.; SAKOMURA, N.K.; DORIGAM, J.C.P. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 alone or in combination with antibiotic growth promoters improves performance in broilers under enteric pathogen challenge. **Poultry Science**, v.98, n.10, p.4391-4400, 2019.
- PAIVA, D.; MCELROY, A. Necrotic enteritis: applications for the poultry industry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.23, n.3, p.557-566, 2014.
- PARK, I.; LEE, Y.; GOO, D. The effects of dietary *Bacillus subtilis* supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immunity, and epithelial barrier integrity in broiler chickens infected with *Eimeria maxima*. **Poultry Science**, v.99, n.2, p.725-733, 2020.
- PETCHKONGKAEW, A.; TAILLANDIER, P.; GASALUCK, P. et al. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B-1 and ochratoxin A detoxification. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n.5, p.1495-1502, 2008.

- RAHMAN, M.; FLISS, I.; BIRON, E. Insights in the development and uses of alternatives to antibiotic growth promoters in poultry and swine production. **Antibiotics**, v.11, n.6, p.1-29, 2022.
- RAMLUCKEN, U.; RAMCHURAN, S.O.; MOONSAMY, G. et al. A novel *Bacillus* based multi-strain probiotic improves growth performance and intestinal properties of *Clostridium perfringens* challenged broilers. **Poultry science**, v.99, n.1, p.331-341, 2020.
- RAMOS, L.D.S.N.; LOPES, J.B.; RIBEIRO, M.N. et al. Aditivos alternativos a antibióticos para frangos de corte no período de 22 a 42 dias de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, p.897-906, 2014.
- RATHNAPRABA, S.; KANAGARAJU, P.; VIJAYARANI, K. Effect of dietary supplementation of probiotic and BMD on the growth performance of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis. **International Journal of Chemical Studies**, v.6, p.13-15, 2018.
- REPIK, C.F.; LISBOA, A.C.L.C.; TUKASAN, B.C. et al. A resistência antimicrobiana na produção animal: alerta no contexto da saúde única. **PUBVET**, v.16, n.04, p.1-6, 2022.
- RITZI, M.M.; ABDEL-RAHMAN, W.; VAN-HEERDEN, K. et al. Combination of probiotics and coccidiosis vaccine enhances protection against an *Eimeria* challenge. **Veterinary Research**, v.47, n.1, p.1-8, 2016.
- SAKAMOTO, K.S.; BENINCASA, N.C.; SILVA, I.J.O. et al. The challenges of animal welfare in modern brazilian poultry farming. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.8, p.131-135, 2020.
- SAND, J.M.; ARENDT, M.K.; REPASY, A. et al. Oral antibody to interleukin-10 reduces growth rate depression due to *Eimeria* spp. infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v.95, n.2, p.439-446, 2016.
- SUN, P.; WANG, J.Q.; ZHANG, H.T. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5851–5855, 2010.
- SUPRIYATI, T.; HARYATI, T.; SUSANTI, T. et al. Nutritional value os rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingrediente for broiler chickens. **Asian Australas Journal of Animal Science**, v.28, n.2, p.231-238, 2015.
- TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. et al. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, v.40, n.4, p.341-347, 2011.
- TIMBERMONT, L.; SMET, L.; VAN NIEUWERBURGH, F. et al. Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. **Veterinary Research**, v.45, n.1, p.1-10, 2014.
- TOROK, V.A.; HUGHES, R.J.; MIKKELSEN, L.L. et al. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.17, p.5868-5878, 2011.
- VIDAL, J.E.; SHAK, J.R.; CANIZALEZ-ROMAN, A. The CpAL quorum sensing system regulates production of hemolysins CPA and PFO to build *Clostridium perfringens* biofilms. **Infection and Immunity**, v.83, n.6, p.2430-2442, 2015.



- VLAMAKIS, H.; CHAI, Y.; BEAUREGARD, P. et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, n.3, p.157-168, 2013.
- WANG, X.; FARNELL, Y.Z.; KIESS, A.S. et al. Effects of *Bacillus subtilis* and coccidial vaccination on cecal microbial diversity and composition of *Eimeria*-challenged male broilers. **Poultry Science**, v.98, n.9, p.3839-3849, 2019.
- WHELAN, R.A.; DORANALLI, K.; RINTTILÄ, T. et al. The impact of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the pathology, performance, and intestinal microbiome of broiler chickens in a necrotic enteritis challenge. **Poultry Science**, v.98, n.9, p.3450-3463, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO [2015]. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>>. Acesso em: 27/11/2022.
- XU, C.; KONG, L.; GAO, H. et al. A review of current bacterial resistance to antibiotics in food animals. **Frontiers in Microbiology**, v.13, p.1-16, 2022.
- ZHANG, Z.F.; CHO, J.H.; KIM, I. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, immune organ relative weight, fecal gas concentration and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**, v.155, n.2-3, p.343-347, 2013.
- ZHAO, Y.; ZENG, D.; WANG, H. et al. Dietary probiotic *Bacillus licheniformis* H2 enhanced growth performance, morphology of small intestine and liver, and antioxidant capacity of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced subclinical necrotic enteritis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.12, n.3, p.883-895, 2020.

### 3. PROBIÓTICOS À BASE DE *BACILLUS* EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* E *EIMERIA* VACINAL

**Resumo** - O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de dois probióticos (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940; Ecobiol<sup>®</sup> e *Bacillus subtilis* DSM 32315; GutCare<sup>®</sup>) em substituição a um antibiótico no desempenho, rendimento de carcaça e cortes, morfometria e escore de lesão intestinal, parâmetros bioquímicos do sangue e concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* vacinal. Um total de 880 machos Cobb 500, com um dia de idade (peso  $43,48 \pm 0,55$ g), foram distribuídos em 4 tratamentos com 10 repetições e com 22 aves cada, em um delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos utilizados foram distribuídos da seguinte forma: ração controle negativo (CN) sem a inclusão de aditivo alimentar; ração controle positivo (CP) + 100 g ton<sup>-1</sup> de enramicina 8%; ração CN + 1000 g ton<sup>-1</sup> de produto à base de Ecobiol<sup>®</sup> - CECT 5940 ( $1,0 \times 10^6$  UFC/g de ração de *B. amyloliquefaciens* BA) e ração CN + 500 g ton<sup>-1</sup> de produto à base de GutCare<sup>®</sup> - DSM 32315 ( $1,0 \times 10^6$  UFC/g de ração de *B. subtilis* BS). Para induzir a enterite necrótica, todas as aves foram inoculadas via gavagem, aos 4 dias de idade, com 20 vezes a dose da vacina contra coccidiose (0,6 mL/ave de Biococcivet R<sup>®</sup>) e aos 7 e 10 dias de idade com 0,5mL da cepa de *C. perfringens* ( $10^8$  UFC/mL) isolada a campo de um surto de enterite necrótica. Os índices zootécnicos foram determinados aos 28 e 42 dias de idade e, também, aos 42 dias, foi realizada a avaliação do rendimento de carcaça e cortes. As concentrações de AGCC e histomorfometria intestinal foram realizadas aos 28 dias. A coleta de sangue para avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos foi realizada aos 21 dias de idade. Os frangos alimentados com a dieta CN tiveram o menor consumo de ração ( $P < 0,0001$ ), pior ganho de peso corporal ( $P < 0,0001$ ) e pior conversão alimentar ( $P < 0,0001$ ) frente aos demais tratamentos. No entanto, os frangos alimentados com as dietas BA e BS tiveram consumo de ração e ganho de peso corporal significativamente maior, além de melhor conversão alimentar em comparação com as aves alimentadas com a dieta CP. No duodeno, os tratamentos CP, BA e BS tiveram vilosidades mais altas ( $P < 0,001$ ). As dietas CP, BA e BS apresentaram maior altura de vilosidade, profundidade de cripta e área de absorção ( $P < 0,001$ ) no jejuno em relação às aves CN. A suplementação com BA 1000 g ton<sup>-1</sup> e BS 500 g ton<sup>-1</sup> melhoram o desempenho de frangos de corte em relação ao antibiótico enramicina com características morfológicas intestinais semelhantes, ao mesmo tempo em que o BA 1000 g ton<sup>-1</sup> favorece uma maior produção de ácido butírico pela microbiota intestinal. Portanto, o uso dos probióticos à base de *Bacillus* adicionados à ração foram capazes de substituir efetivamente o uso do antibiótico enramicina 8%, sob um desafio intestinal induzido padronizado, sem alteração no perfil bioquímico e enzimático das aves.

**Palavras-chave:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, coccidiose, enterite necrótica.

**BACILLUS-BASED PROBIOTICS IN BROILER CHICKEN DIETS CHALLENGED  
WITH *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* AND VACCINE *EIMERIA***

**Abstract** – The objective of the present study was to evaluate the use of two probiotics (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940: Ecobiol® and *Bacillus subtilis* DSM 32315: GutCare®) as a replacement for an antibiotic in the performance, carcass, and cut yields, intestinal morphometry and lesion score, blood biochemical parameters, and short-chain fatty acid (SCFA) concentration in broilers challenged with *Clostridium perfringens* and *Eimeria* vaccine. A total of 880 one-day-old Cobb 500 males (weight:  $43.48 \pm 0.55$ g) were assigned to 4 treatments with 10 replicates and 22 birds each, in an entirely randomized design. The treatments used were distributed as follows: negative control feed (NC) without the inclusion of feed additives; positive control feed (PC) + 100 g ton<sup>-1</sup> of 8% enramycin; NC feed + 1000 g ton<sup>-1</sup> of Ecobiol® - CECT 5940 ( $1.0 \times 10^6$  CFU/g of *B. amyloliquefaciens* BA feed); NC feed + 500 g ton<sup>-1</sup> of GutCare® - DSM 32315 ( $1.0 \times 10^6$  CFU/g of *B. subtilis* BS feed). To induce necrotic enteritis, all birds were inoculated by gavage at 4 days of age with 20 times the dose of coccidiosis vaccine (0.6 mL/bird of Biococcivet R®) and at 7 and 10 days of age with 0.5 mL of *C. perfringens* culture ( $10^8$  CFU/mL) isolated in the field from an outbreak of necrotic enteritis. The zootechnical parameters were determined at 28 and 42 days of age, and at 42 days, the carcass and cut yields were evaluated. The concentrations of SCFA and intestinal histomorphometry were performed at 28 days of age. The blood harvest for the evaluation of biochemical and enzymatic parameters was performed at 21 days of age. Chickens fed the NC diet had the lowest feed intake ( $P < 0.0001$ ), body weight gain ( $P < 0.0001$ ), and worst feed conversion ( $P < 0.0001$ ) compared to the other treatments. However, the chickens fed diets BA and BS had significantly higher feed intake and body weight gain and better feed conversion compared to the birds fed the PC diet. In the duodenum, the PC, BA, and BS treatments had higher villi ( $P < 0.001$ ). The PC, BA, and BS diets had higher villus height, crypt depth, and absorptive area ( $P < 0.001$ ) in the jejunum compared to the NC. Supplementation with Ecobiol® - CECT 5940 (1000 g ton<sup>-1</sup>) and GutCare® - DSM 32315 (500 g ton<sup>-1</sup>) improved broiler performance relative to the antibiotic enramycin with similar intestinal morphological characteristics, while BA (1000 g ton<sup>-1</sup>) favored greater butyric acid production by the intestinal microbiota. Therefore, the use of *Bacillus* probiotics added to the feed was able to effectively replace the use of the antibiotic enramycin 8% under an induced intestinal challenge, with no change in the biochemical and enzymatic profile of the birds.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, coccidiosis, necrotic enteritis.

### 3.1 Introdução

As doenças entéricas são uma grande preocupação na indústria avícola, tanto do ponto de vista econômico quanto sanitário e produtivo (ABD EL-HACK et al., 2022). A enterite necrótica (EN) é uma enterotoxemia que chega a causar perdas anuais de US\$ 6 bilhões em todo o mundo (FATHIMA et al., 2022). Esses custos estão relacionados principalmente à perda de produtividade, com o comprometimento do desempenho das aves e o uso de medicamentos profiláticos (PAIVA; MCELROY, 2014).

A EN é uma doença multifatorial que pode se apresentar na forma clínica ou subclínica nas aves. A forma subclínica é a mais preocupante, pois impacta o crescimento e a conversão alimentar das aves, além de aumentar a condenação dos lotes de frangos por colangiohepatite (PAIVA; MCELROY, 2014; HOFACRE et al., 2018).

O principal agente etiológico associado à EN é a bactéria gram-positiva formadora de esporos *Clostridium perfringens*, comumente encontrada na natureza ou no trato gastrointestinal dos animais (MWANGI et al., 2019). Fatores como alterações na ração, baixa imunidade e doenças como coccidiose podem favorecer o crescimento descontrolado dessa cepa, o que, conseqüentemente, promove o surgimento da EN em aves (BIAGINI et al., 2022). Atualmente, a maior preocupação é a presença de coinfeções de *C. perfringens* com protozoário *Eimeria* spp. causador da coccidiose, pois a associação dessas infecções entéricas pode agravar ainda mais o quadro de EN nas aves (BORTOLUZZI et al., 2019).

As lesões causadas por esses patógenos trazem mudanças na dinâmica microbiana, má absorção de nutrientes, retardo no crescimento, presença de diarreia sanguinolenta e distúrbios imunológicos graves à saúde da ave (ADHIKARI et al., 2020; MADLALA et al., 2021). Em vista disso, os antibióticos foram, por muito tempo, utilizados como promotores de crescimento. Entretanto, o crescente aumento da resistência microbiana restringiu seu uso na saúde animal (ABD EL-HACK et al., 2022; RAHMAN et al., 2022).

Com o objetivo de reduzir a incidência de bactérias multirresistentes, os probióticos provenientes de microorganismos vivos tornaram-se excelentes meios de prevenção de doenças no setor avícola (BAJAGAI et al., 2016; AYALEW et al. 2022). Entre as cepas, o gênero *Bacillus* spp. tem sido empregado para fabricação e manipulação a nível industrial devido à sua resistência a altas temperaturas e variações de pH, bem como sua comprovada sobrevivência ao ambiente ácido do trato gastrointestinal dos animais (JHA et al., 2020; KULKARNI et al., 2022).

Nesse viés, pesquisas têm demonstrado que o uso de cepas de *Bacillus* spp. como probióticos em frangos desafiados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. melhorou a absorção de nutrientes, o desempenho, a imunidade e a integridade do epitélio intestinal (HOSSAIN et al., 2015; RATHNAPRABA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; PARK et al., 2020; MEMON et al., 2021; BIAGINI et al., 2022).

Embasada nessas informações, a hipótese deste trabalho é de que os probióticos de *Bacillus* podem ser uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento em rações de frangos de corte, resultando melhora no desempenho e na morfometria intestinal, além de reduzir lesões intestinais causadas por patógenos entéricos.

Nesse aspecto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de dois probióticos (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940; Ecobio1® e *Bacillus subtilis* DSM 32315; GutCare®) em substituição a enramicina no desempenho, rendimento de carcaça e cortes, morfometria e escore de lesão intestinal, parâmetros bioquímicos e a concentração de ácidos graxos de cadeia curta em frangos de corte desafiados com *C. Perfringens* e *Eimeria* vacinal.

### 3.2 Material e métodos

O ensaio experimental foi realizado no Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *campus* de Marechal Cândido Rondon/PR. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (Protocolo nº 20/2020).

As aves foram alojadas em um aviário de alvenaria com ventilação sob pressão negativa, em forma de túnel e resfriamento evaporativo. O aviário experimental utilizado possui 35 metros de comprimento e 13 metros de largura com divisões em boxes. Cada box ou unidade experimental (UE) possuía uma área de 1,96m<sup>2</sup> com um comedouro tubular, bebedouro tipo *nipple* e piso de concreto, o qual foi recoberto com maravalha de pinus reutilizada por quatro lotes. A temperatura ambiental foi controlada pelo painel *Smaai IV*, o qual aciona o forno de aquecimento em *pellet*, os quatro exaustores e as placas evaporativas.

O programa de iluminação utilizado foi seguido de acordo com recomendação do manual de linhagem, sendo nos 0 dias 24h de luz, 1° dia 1h de escuro, do 2° até 7° dia 10h de escuro, do 8° até 22° dia 9h de escuro, do 23° até 28° dia 8h de escuro e do 29° até 42° dia 6h de escuro.

O resfriamento do ambiente e a renovação do ar foram realizados por exaustores e placas evaporativas. A temperatura e a umidade relativa média, mínima e máxima foram monitoradas diariamente e mantidas dentro da faixa de conforto térmico recomendada para cada fase.

Ao todo, foram utilizados 880 pintos de corte machos, da linhagem comercial Cobb 500 com um dia de idade e peso médio inicial de  $43,48 \pm 0,55$ g, os quais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, 10 repetições e 22 aves por unidade experimental. Os tratamentos utilizados foram distribuídos da seguinte forma: ração controle negativo (CN) sem a inclusão de aditivo alimentar; ração controle positivo (CP) com a inclusão de  $100 \text{ g ton}^{-1}$  de enramicina 8% até os 35 dias de idade; ração CN com a inclusão de  $1000 \text{ g ton}^{-1}$  de probiótico à base de *Bacillus amyloliquefaciens* (Ecobiol<sup>®</sup> - CECT 5940) ( $1,0 \times 10^6$  UFC/g de ração) e ração CN com a inclusão de  $500 \text{ g ton}^{-1}$  de probiótico à base de *Bacillus subtilis* (GutCare<sup>®</sup> - DSM 32315) ( $1,0 \times 10^6$  UFC/g de ração).

As dietas experimentais (isonutritivas e isocalóricas) foram formuladas à base de milho e farelo de soja, mediante a composição dos alimentos e exigências recomendadas por Rostagno et al. (2017) para as fases de 1 a 21 (inicial), 22 a 35 (crescimento) e de 36 a 42 (terminação) dias de idade (Tabela 3). As aves receberam ração na forma farelada e água *ad libitum* por todo o período experimental. A utilização dos aditivos (enramicina 8%; Ecobiol<sup>®</sup> e GutCare<sup>®</sup>) foi realizada em substituição de peso por peso ( $\text{g g}^{-1}$ ) pelo material inerte da ração.

No 4º dia de vida, todas as aves receberam o desafio com 20 vezes a dose da vacina Biococcivet R<sup>®</sup> (suspensão concentrada de oocistos esporulados de 5 espécies de *Eimeria* spp.: *E. acervulina*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. tenella* e *E. mitis*). Nos 7º e 10º dias de idade, todas as aves receberam uma solução de 0,5mL de inóculo de cultura com *C. perfringens* ( $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) diretamente no esôfago, na região próxima ao papo. Essa cepa de *C. perfringens* é uma amostra proveniente de campo, isolada de um surto de enterite necrótica em frangos de corte.

Tabela 3. Composição percentual e calculada das rações experimentais

Ingredientes g/kg	1 a 21 dias	22 a 35 dias	36 a 42 dias
Milho (7,88%)	579,567	645,698	646,790
Farelo de soja (46%)	336,108	262,165	264,818
Óleo de soja degomado	16,233	28,088	36,063
Farinha de carne e ossos	50,988	48,993	35,618
Calcário calcítico	2,557	0,990	3,879
Sal pecuário	4,176	3,734	3,688
Lisina sulfato (54,7%)	1,078	1,444	1,036
DL-Metionina (99%)	2,674	2,294	2,169
L-Treonina (99%)	0,428	0,450	0,392
Cloreto de colina (60%)	0,837	0,790	0,445
Premix vitamínico <sup>1</sup>	1,300	1,300	1,300
Premix mineral <sup>2</sup>	0,500	0,500	0,500
Adsorvente <sup>3</sup>	1,000	1,000	1,000
Anticoccidiano <sup>4</sup>	0,500	0,500	0,250
Fitase <sup>5</sup>	0,050	0,050	0,050
Inerte <sup>6</sup>	2,000	2,000	2,000
Composição nutricional calculada			
Energia metabolizável (kcal kg <sup>-1</sup> )	3.000	3.150	3.200
Proteína bruta (g kg <sup>-1</sup> )	225,20	196,30	191,30
Lisina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	11,10	9,60	9,20
Met. + Cist. digestível (g kg <sup>-1</sup> )	8,20	7,60	7,10
Treonina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	7,10	6,20	6,10
Valina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	8,80	7,70	7,50
Triptofano digestível (g kg <sup>-1</sup> )	2,20	1,80	1,80
Arginina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	13,60	11,60	11,30
Isoleucina (g kg <sup>-1</sup> )	7,90	6,70	6,70
Cálcio (g kg <sup>-1</sup> )	9,50	8,50	8,00
Fósforo disponível (g kg <sup>-1</sup> )	4,50	4,30	3,80
Sódio (g kg <sup>-1</sup> )	2,10	1,90	1,80
Potássio (g kg <sup>-1</sup> )	9,20	7,90	7,80
Cloro (g kg <sup>-1</sup> )	3,50	3,20	3,00

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta: Vitamina A (min) 14.300 U.I.; Vitamina D<sub>3</sub> (min) 5.200 U.I.; Vitamina E (min) 71,50 U.I.; Vitamina K<sub>3</sub> (min) 3,90 mg; Vitamina B<sub>1</sub> (min) 2,99 0mg; Vitamina B<sub>2</sub> (min) 9,10 mg; Ácido pantotênico (min) 15,60 mg; Vitamina B<sub>6</sub> (min) 5,20 mg; Vitamina B<sub>12</sub> (min) 32,50 mg; Ácido nicotínico (min) 78,00 mg; Ácido fólico (min) 2,60 mg; Biotina (min) 0,33 mg; Selênio (min) 0,39 mg;

<sup>2</sup>Suplemento mineral, composição por kg de dieta: Ferro (min) 50g; Cobre (min) 10g; Manganês (min) 65g; Zinco (min) 65g; Iodo (min) 1000mg.

<sup>3</sup>Adsorvente a base de bentonita;

<sup>4</sup>Anticoccidiano: de 1 a 35 dias de idade utilizado salinomicina 12% e de 36 a 42 dias de idade salinomicina 24%;

<sup>5</sup>Fitase: quantum blue 10g, 10.000 FTU g<sup>-1</sup>;

<sup>6</sup>Inerte. caulim.

### 3.2.1 Desempenho zootécnico

Para avaliação do desempenho zootécnico, o peso das aves e a ração foram registrados aos 1, 28 e 42 dias de idade. Os índices obtidos foram o ganho de peso médio (GPM), o consumo médio de ração (CMR), a conversão alimentar (CA), a viabilidade (V) e o índice de eficiência produtivo (IEP). A mortalidade foi observada diariamente e os comedouros foram pesados para a realização das correções no consumo de ração e conversão alimentar, segundo Sakomura e Rostagno (2016).

### 3.2.2 Rendimento de carcaça, cortes e peso relativo dos órgãos

Aos 42 dias de idade, duas aves por unidade experimental foram selecionadas aleatoriamente, pesadas, marcadas e abatidas por eletronarcolese seguido de sangria, escaldagem, depena e evisceração. As carcaças foram pesadas e espostejadas, obtendo as pernas (coxa e sobrecoxa), asa, filé de peito e *sassami*, os quais foram pesados individualmente. O rendimento de carcaça foi determinado pelo peso da carcaça em função do peso vivo da ave. O rendimento de cortes foi determinado em função do peso dos cortes e o peso da carcaça. O fígado e a gordura abdominal (constituída pelo tecido adiposo presente ao redor da cloaca, moela, proventrículo e dos músculos abdominais adjacentes) foram separados e pesados para determinar o peso relativo deles em função do peso vivo da ave.

### 3.2.3 Parâmetros bioquímicos

Aos 21 dias de idade, foram coletadas amostras de sangue de duas aves por unidade experimental. O sangue foi coletado via punção braquial pela veia ulnar, com as aves em posição de decúbito lateral. Para o procedimento, foram utilizados tubos específicos de coleta de sangue a vácuo, em vidro 13 x 75 mm, com ativador de coágulo e capacidade de 5 ml (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil), adaptadores específicos e agulhas de 25 x 0,8 mm (Labor Import, Shandong Weigao, China), de onde foram extraídos 4 ml de sangue por coleta. Após a coleta, as amostras permaneceram 15 minutos em decúbito horizontal e, posteriormente, foram centrifugadas (Kasvi brand, K14-4000, Paraná, Brasil) a 2500 rpm (1050g) por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a separação do soro, estas foram identificadas e acondicionadas



em microtubos (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil) de 2 ml, sendo armazenadas em freezer a -20°C, até o momento de realização das análises (NUNES et al., 2018). Para realização das leituras, as amostras foram descongeladas sob refrigeração (4 °C), permanecendo em geladeira por 24 horas. Antes da realização das análises, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf® brand, Minispin®, Hamburg, Germany) a 1050 g por 10 minutos em temperatura ambiente para retirada de possível presença de fibrina.

As leituras dos parâmetros bioquímicos foram realizadas utilizando analisador bioquímico automático, com espectrofotometria por meio do equipamento Flexor EL200 (Elitech® brand, Flexor EL200 model, Puteaux, France), utilizando reagentes, calibradores (Elical II) e padrões de aferição (Elitrol I) da marca Elitech ®. Os parâmetros avaliados foram ácido úrico (AU), o qual foi realizado com base no método Trinder enzimático colorimétrico de ponto final (TRINDER, 1969); glicose (GLI), pelo método de Trinder enzimático colorimétrico cinético (TRINDER, 1969); colesterol (COL) pelo método de Trinder enzimático colorimétrico de ponto final (ALLAIN et al. 1974); triglicerídeos (TRI) pelo método enzimático colorimétrico de ponto final (FOSSATI E PRENCIPE, 1982); proteínas totais (PT) pelo método de biureto de ponto final (RIFAI et al., 2018); albumina (ALB) pelo método colorimétrico verde de bromocresol (BCG) (DOUMAS & BIGGS, 1972; WU, 2006); e creatinina (CRE) pelo método de Jaffe colorimétrico cinético (RIFAI et al., 2018).

Também foram realizadas as determinações das atividades enzimáticas para aspartato aminotransferase (AST) pelo método IFCC sem fosfato de piridoxal, cinético, UV (SCHUMAN et al., 2002a); alanina aminotransferase (ALT) pelo método IFCC sem fosfato de piridoxal, cinético, UV (SCHUMAN et al., 2002b); gamma glutamiltransferase (GGT) pelo método substrato glupa C, cinético (SCHUMAN et al., 2002c); Desidrogenase láctica (LDH) pelo método IFCC, cinético (SCHUMANN et al., 2002d) e Creatina fosfoquinase (CPK) pelo método IFCC, cinético (SCHUMANN et al., 2002e).

### **3.2.4 Morfometria intestinal**

Para avaliação da morfometria intestinal (altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilocripta), uma ave por unidade experimental foi abatida por deslocamento cervical para retirada do aparelho digestivo aos 28 dias. O intestino delgado foi exposto, o duodeno e o jejuno separados, sendo coletada a porção média de duodeno com pâncreas, um fragmento de 2 a 5 cm e identificado o divertículo de Meckel, também, realizada a coleta de um fragmento

com aproximadamente 2 a 5 cm antes do divertículo de Meckel. Os fragmentos de duodeno e jejuno foram fixados em solução de formalina tamponada (10%), para posterior clivagem em fragmentos transversais de 2 a 3 mm. As amostras são colocadas por um período de 24 horas no aparelho histotécnico, desidratados em séries crescentes de álcool, xilol e incluídas em parafina. Cortes semisseriados de 1,5 micrometros de cada segmento foram dispostos em lâmina de vidro e corados pela técnica de hematoxilina-eosina de acordo com Luna (1968).

As mensurações foram realizadas utilizando o sistema de imagens Toup View 3.7, que está acoplado à câmera Opticam e ao microscópio Olympus (modelo CX31RTSF). Para cada lâmina, foram mensurados o comprimento e a largura de 10 vilos e a profundidade e largura de 10 criptas. Estas medidas morfométricas foram utilizadas para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, por meio da fórmula proposta por Kisielinski et al. (2002). Em adição, foi calculada a relação altura de vilos e profundidade de cripta, dividindo-se o valor da altura do vilos pelo valor de profundidade de cripta.

### **3.2.5 Determinação macroscópica do escore de lesão intestinal**

Aos 28 dias, foi realizada a avaliação macroscópica das lesões de *Eimeria* spp. na totalidade do intestino, a partir das aves que foram sacrificadas para a realização da análise de morfometria intestinal. As lesões de *Eimeria* spp. foram avaliadas segundo o grau de severidade definido por Johnson e Reid (1970): grau 0 (ausência de lesões), grau 1 (estrias ou petéquias na mucosa), grau 2 (presença de estrias brancas ou petéquias mais numerosas), grau 3 (identificação de extensa hemorragia) e grau 4 (identificação de extensa hemorragia e presença de necrose).

### **3.2.6 Determinação dos ácidos graxos de cadeia curta**

Com a idade de 28 dias, para quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), uma ave por UE foi sacrificada para coleta do conteúdo cecal, conforme descrito por Del Valle et al. (2018). O conteúdo cecal foi retirado, e 200 mg foram pesadas e transferidas para microtubos (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil) de 2 ml devidamente identificados. Após a adição de 1800 µl de solução de NaOH a 1% (m/v), o conteúdo foi vigorosamente homogeneizado em vortex multifuncional (Kasvi Brand, K40-1010, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) por 2

minutos a 3.000 rpm. Após homogeneização, os microtubos foram centrifugados (Kasvi Brand, K14-4000, Paraná, Brasil) a 1050 g por 5 minutos, para completa sedimentação da fração sólida da amostra. Um volume total de 900 µl do sobrenadante foram transferidos (Micropipeta monocanal Plus 100 – 1000 µl, Kasvi, K1 - P1000, Paraná, Brasil) para novos microtubos (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil) que foram acidificados com 50 µl (Micropipeta monocanal Plus 10 – 100 µl, Kasvi, K1 - P100, Paraná, Brasil) de solução de ácido orto-fosfórico 50% (m/v). As amostras acidificadas foram homogeneizadas (Kasvi Brand, K40-1010, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) por 30 segundos a 3.000 rpm e armazenadas em freezer a -20°C até a realização das leituras.

As concentrações dos ácidos acético, propanóico, isobutírico, butírico, valérico e isovalérico nas amostras foram determinadas por cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo Shimadzu© GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Stabilwax-DA™ (30m, 0,25mm DI, 0,25µm df, Restek©) e detector de ionização de chama (FID), após acidificação com ácido o-fosfórico 1 M p.a. (Ref. 100573, Merck©) e fortificação com uma mistura de ácidos voláteis livres (Ref. 46975, Supelco©).

Uma alíquota de 1µL de cada amostra foi injetada com *split ratio* de 40:1, utilizando hélio como gás carreador com velocidade linear de 42 cm s<sup>-1</sup>, obtendo-se a separação dos analitos em uma corrida cromatográfica de 11,5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 250°C e 300°C, e a temperatura inicial da coluna foi de 40°C. A rampa de temperatura da coluna começou com um gradiente de 40 a 120°C a uma taxa de 40°C min<sup>-1</sup>, seguido de um gradiente de 120 a 180°C a uma taxa de 10°C min<sup>-1</sup> e de 180 a 240°C a uma taxa de 120°C min<sup>-1</sup>, mantendo a temperatura em 240°C por mais 3 minutos ao final.

Para a quantificação dos analitos, uma calibração do método foi realizada com diluições do padrão WSFA-2 (Ref. 47056, Supelco®) e ácido acético glacial (Ref. 33209, Sigma-Aldrich®), analisados nas condições descritas acima. A determinação e a integração dos picos foram realizadas utilizando o software GCsolution v. 2.42.00 (Shimadzu©). Os resultados foram expressos em mmol kg<sup>-1</sup>.

### 3.2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade e de homogeneidade. Aqueles que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância e, havendo efeito (P<0,05), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os dados que

não apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis e, ainda, havendo efeito ( $P < 0,05$ ), os tratamentos foram comparados pelo teste de Dunn a 5%. Todos os procedimentos foram realizados com auxílio do programa estatístico SAS (Versão OnDemand).

### 3.3 Resultados e Discussão

Na avaliação de desempenho dos frangos de corte aos 28 e 42 dias de idade, houve efeito dos tratamentos com *B. amyloliquefaciens* (BA), *B. subtilis* (BS) e o antibiótico enramicina (CP) frente às variáveis CMR, GPM e CA ( $P < 0,0001$ ) em comparação com o tratamento sem a inclusão de aditivo alimentar (CN) ( $P < 0,0001$ ). Dentre os aditivos alimentares, as aves alimentadas com BA apresentaram maior CMR e GPM, aos 28 dias de idade, em comparação com CP e CN. A avaliação aos 42 dias de idade para BS demonstrou que o desempenho foi similar à BA, sendo igualmente eficiente em reduzir o impacto da EN. Além disso, ressalta-se que, aos 42 dias de idade, foi observado que as aves alimentadas com os dois probióticos tiveram maior CMR e GPM frente ao antibiótico enramicina ( $P < 0,0001$ ). Nos lotes de frangos alimentados com os aditivos (CP, BA e BS) houve efeito significativo para a viabilidade e índice de eficiência produtivo ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Desempenho de frangos de corte de 1 a 28 e 1 a 42 dias de idade desafiados com *Eimeria* vacinal e *C. perfringens* e alimentados com dietas suplementadas com probióticos *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamento	1 a 28 dias de idade			1 a 42 dias de idade				
	CMR (g)	GPM (g)	CA (g g <sup>-1</sup> )	CMR (g)	GPM (g)	CA (g g <sup>-1</sup> )	V (%)	IEP
CN	983 <sup>c</sup>	626 <sup>c</sup>	1,792 <sup>a</sup>	2602 <sup>c</sup>	1731 <sup>c</sup>	1,825 <sup>a</sup>	75,76 <sup>b</sup>	172,63 <sup>b</sup>
CP	2290 <sup>b</sup>	1470 <sup>b</sup>	1,558 <sup>b</sup>	4631 <sup>b</sup>	2875 <sup>b</sup>	1,611 <sup>b</sup>	94,09 <sup>a</sup>	407,63 <sup>a</sup>
BA	2353 <sup>a</sup>	1514 <sup>a</sup>	1,544 <sup>b</sup>	4770 <sup>a</sup>	2972 <sup>a</sup>	1,580 <sup>b</sup>	91,82 <sup>a</sup>	417,37 <sup>a</sup>
BS	2317 <sup>ab</sup>	1476 <sup>b</sup>	1,553 <sup>b</sup>	4736 <sup>a</sup>	2951 <sup>a</sup>	1,585 <sup>b</sup>	93,39 <sup>a</sup>	417,95 <sup>a</sup>
EPM	44,63	34,95	0,04	74,82	59,82	0,04	4,54	27,43
CV (%)	2,19	2,69	2,22	1,76	2,24	2,24	5,05	7,39
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

CMR: consumo médio de ração (g); GPM: ganho de peso médio (g); CA: conversão alimentar (g g<sup>-1</sup>); V (%): Viabilidade; IEP: índice de eficiência produtivo; CN: controle negativo (sem inclusão de aditivo alimentar); CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol<sup>®</sup>); BS: *B. subtilis* (GutCare<sup>®</sup>); EPM: erro padrão da média; CV (%): coeficiente de variação; P: probabilidade estatística; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os frangos desafiados com *Eimeria* e *C. perfringens* apresentaram piora no desempenho, contudo, a adição do antibiótico enramicina e dos probióticos de *B. amyloliquefaciens* e de *B. subtilis* conseguiram inibir os efeitos da EN, promovendo um melhor desempenho e CA.

Alguns autores também mostraram resultados favoráveis para CA ao avaliar o uso de probióticos à base de *Bacillus* spp. na alimentação de frangos desafiados com EN, sugerindo que o uso desses aditivos pode melhorar a absorção de nutriente e a utilização de energia pelas aves (JAYARAMAN et al., 2013; ALJUMAAH et al., 2020; RAMLUCKEN et al., 2020).

As melhoras observadas no desempenho das aves com a adição de probióticos na ração, podem estar relacionadas à capacidade das cepas de *Bacillus* spp. em formar biofilmes no epitélio intestinal que impedem a adesão de patógenos (HONG et al., 2009; KONIECZKA et al., 2018). Além disso, foi comprovado o potencial desse gênero em secretar peptídeos antimicrobianos que conferem proteção contra potenciais patógenos, como *C. perfringens* (LISBOA et al., 2006; ULYANOVA et al., 2011; CALY et al., 2015).

Outros achados comprovaram que as cepas de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* podem produzir enzimas exógenas como celulase e xilanase (LARSEN et al., 2014), o que promove maior digestibilidade dos nutrientes presentes na ração. Farhat-Khemakhem et al. (2018), em um estudo *in vitro*, mostraram que a cepa de *B. amyloliquefaciens* pode produzir várias enzimas digestivas, como fitase, xilanase,  $\beta$ -glucanase e amilase, as quais têm a capacidade de hidrolisar componentes antinutricionais nas rações, como carboidratos complexos (oligossacarídeos e dissacarídeos). Jeon et al. (2017) também encontraram atividade enzimática de amilase e protease em testes com uma cepa de *B. subtilis*, demonstrando o potencial da espécie como probiótico.

Larsen et al. (2014) comprovaram em seu estudo *in vitro* o efeito dos *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* em inibir o crescimento de cepas patogênicas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *C. perfringens*, indicando o potencial das cepas de *Bacillus* em inibir patógenos gastrointestinais. Apoiando esses achados, estudos *in vivo* com frangos de corte demonstraram que cepas de *Bacillus* spp. inibiram o crescimento de patógenos como *C. perfringens* (HERNANDEZ-PATLAN et al., 2019; WHELAN et al., 2019) e *E. coli* (AHMED et al., 2014; HONG et al., 2019) no intestino das aves.

Estudos de Sun et al. (2022) demonstraram que a adição de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 em dietas de frangos de corte até os 42 dias de idade melhorou o desempenho, a capacidade antioxidante, a imunidade humoral, bem como foi capaz de aumentar a atividade de enzimas gastrointestinais endógenas (amilase, lipase e quimotripsina).

Whelan et al. (2019) ao adicionarem o probiótico de *B. subtilis* DSM 32315 na alimentação dos frangos de corte até os 35 dias de idade desafiados com EN, observaram uma melhor CA e recuperação parcial no desempenho das aves, sugerindo que esses resultados estão relacionados à colonização intestinal da cepa, o que, conseqüentemente, favoreceu a proliferação de bactérias benéficas na microbiota e controlou a população de *C. perfringens*. Neste contexto, Bortoluzzi et al. (2019) observaram recuperação no GPM e CA em frangos aos 42 dias de idade acometidos por EN e alimentados com *B. subtilis* DSM 32315. Além disso, ao avaliar a dinâmica da microbiota intestinal, propôs uma relação positiva com o desempenho frente às alterações encontradas para as funções metabólicas da microbiota e na diversidade alfa e beta no íleo e ceco.

Sandvang et al. (2021) observaram melhora no GPM e CA em frangos alimentados com associação de duas cepas de *B. subtilis* e uma cepa de *B. Amylolyquefaciens* na fase de terminação (35 a 42 dias de idade), demonstrando o potencial dessas espécies de *Bacillus* na suplementação de frangos de corte para melhorar a saúde intestinal e o desempenho das aves desafiadas com *C. perfringens*.

Para o rendimento de carcaça, cortes, percentual de gordura abdominal e peso relativo do fígado houve diferença entre o tratamento com (CP, BA e BS) e sem aditivo alimentar (CN) ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 5). Foi observado maior rendimento da carcaça e cortes para os frangos alimentados com os aditivos alimentares, com exceção do rendimento de pernas ( $P < 0,0001$ ) e de asa ( $P = 0,016$ ).

Tabela 5. Rendimento de carcaça e cortes, percentual de gordura abdominal e peso relativo do fígado em frangos de corte, aos 42 dias de idade, desafiados com *Eimeria* vacinal e *C. perfringens* e alimentados com dietas suplementadas com probióticos *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamento	RC (%)	RF (%)	RP (%)	RA (%)	RS (%)	GA (%)	PF (%)
CN	65,11 <sup>b</sup>	23,35 <sup>b</sup>	34,66 <sup>a</sup>	10,37 <sup>a</sup>	4,44 <sup>b</sup>	1,10 <sup>b</sup>	2,35 <sup>a</sup>
CP	69,57 <sup>a</sup>	27,39 <sup>a</sup>	31,94 <sup>b</sup>	9,57 <sup>b</sup>	5,55 <sup>a</sup>	1,54 <sup>a</sup>	1,87 <sup>b</sup>
BA	70,18 <sup>a</sup>	27,84 <sup>a</sup>	32,34 <sup>b</sup>	9,39 <sup>b</sup>	5,42 <sup>a</sup>	1,62 <sup>a</sup>	1,87 <sup>b</sup>
BS	69,67 <sup>a</sup>	27,57 <sup>a</sup>	32,28 <sup>b</sup>	9,53 <sup>b</sup>	5,65 <sup>a</sup>	1,59 <sup>a</sup>	1,90 <sup>b</sup>
EPM	1,59	1,56	0,99	0,66	0,36	0,28	0,17
CV (%)	2,32	5,84	3,04	6,86	6,81	19,25	8,60
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,016	<0,0001	0,0008	<0,0001

RC: rendimento de carcaça (%); RF: rendimento de filé de peito (%); RP: rendimento de pernas (%); RA: rendimento de asa (%); RS: rendimento do filé *sassami* (%); GA: percentual de gordura abdominal (%); PF: peso relativo do fígado (%); CN: controle negativo (sem inclusão de aditivo alimentar); CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol®); BS: *B. subtilis* (GutCare®); EPM: erro padrão da média; CV (%): coeficiente de variação; P: probabilidade estatística; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Uma melhor CA indicou que as aves foram mais eficientes em utilizar os nutrientes para deposição de músculo, e isso pode ter resultado significativo no rendimento de carcaça observado para as aves que receberam os probióticos, sendo igualmente eficientes no grupo que recebeu a enramicina. Apoiando esses achados, Oliveira et al. (2019) demonstraram que o rendimento de carcaça apresentou melhor resultado em comparação com o CN em frangos suplementados com probiótico de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 e desafiados com EN. Hussein et al. (2020a), ao suplementarem uma cepa de *B. subtilis* em frangos de corte desafiados com *C. perfringens*, não encontraram diferenças no rendimento de peito e perna, percentual de gordura abdominal e peso relativo do fígado.

Neste estudo, foi observado que o peso relativo do fígado foi menor em aves suplementadas com os probióticos de *Bacillus*, sugerindo uma possível redução da inflamação no órgão causada pela EN, melhorando a resistência da ave à doença. Ramlucken et al. (2020), ao avaliarem o efeito de um probiótico multi-estirpe de *Bacillus* em frangos de corte desafiados com *C. perfringens*, observaram que o tratamento sem o probiótico promoveu aumento no peso relativo do fígado, sugerindo que a infecção subclínica por *C. perfringens* causou inflamação do fígado. Segundo Van Immerseel et al. (2004), é possível que um alto número de bactérias *C. perfringens* no intestino delgado das aves passem para os ductos biliares e circulação porta até atingir o fígado.

Referente às diferenças no rendimento de filé de peito, pernas e asa, Cao et al. (2018), ao estudarem o metaboloma de frangos de corte, verificaram que a adição de *B. amyloliquefaciens* ou antibiótico na dieta mudou as concentrações dos metabólitos do conteúdo cecal das aves, e essa alteração influenciou o metabolismo de aminoácidos.

Como o músculo do peito é considerado um dos principais locais de armazenamento de proteínas, principalmente devido às diferentes fibras musculares que o compõe em comparação com demais partes (pernas e asas) da ave, as alterações nos aminoácidos podem influenciar a formação da musculatura (TESSERAUD et al., 1996; ISMAIL; JOO, 2017). Assim, é possível que os aditivos alimentares alterem o metabolismo de aminoácidos, conseqüentemente, a deposição de proteína no músculo, o que contribuiu para as diferenças encontradas para o rendimento dos cortes. Acrescenta-se ser perceptível que o desafio de EN ocasionou piora no rendimento de carcaça, filé de peito e filé *sassami*.

Referente à gordura abdominal, alguns autores não observaram diferenças entre os tratamentos (ABDEL-RAHEEM e ABD-ALLAH et al., 2011) ou observaram diminuição (QING et al., 2017) desse parâmetro com o uso de probióticos. Nossos resultados demonstraram maior deposição de gordura em frangos suplementados, o que provavelmente está relacionado

ao CMR e GPM maiores nos tratamentos com aditivo alimentar, visto que o consumo de níveis mais altos de ração e, portanto, de energia, possivelmente causaram maior deposição de gordura abdominal.

Os parâmetros bioquímicos avaliados aos 21 dias de idade não foram influenciados pelo uso dos probióticos e do antibiótico ( $p>0,05$ ) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Perfil bioquímico sérico de frangos de corte, aos 21 dias de idade, desafiados com *Eimeria vacinal* e *C. perfringens* e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamento	GLI	COL	TRI	ALB	PT	AU	CRE
CN	271,62	153,67	156,75	12,47	28,31	4,05	0,21
CP	280,26	167,94	145,85	13,56	29,11	3,96	0,21
BA	282,06	165,94	147,05	13,51	30,15	4,39	0,22
BS	275,89	163,46	152,82	13,63	30,03	3,78	0,22
EPM	10,98	15,26	31,19	1,22	2,30	0,82	0,03
CV (%)	3,95	9,36	20,76	9,17	7,81	20,27	13,04
P	0,200	0,207	0,846	0,144	0,250	0,357	0,920

GLI: glicose (mg/dL); COL: colesterol (mg/dL); TRI: triglicerídeos (mg/dL); ALB: albumina (g/L); PT: proteínas totais (g/L); AU: ácido úrico (mg/dL); CRE: creatinina (mg/dL); CN: controle negativo (sem inclusão de aditivo alimentar); CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol®); BS: *B. subtilis* (GutCare®); EPM: erro padrão da média; CV (%): coeficiente de variação; P: probabilidade estatística; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 7. Perfil enzimático sérico de frangos de corte, aos 21 dias de idade, desafiados com *Eimeria vacinal* e *C. perfringens* e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamento	ALT	AST	LDH	GGT	CPK
CN	6,87	253,61	925,89	21,18	5338,89
CP	6,63	305,22	1135,44	21,58	5802,22
BA	7,45	306,75	969,36	23,57	3602,50
BS	6,36	277,53	959,25	21,88	4270,00
EPM	1,69	77,67	268,71	3,91	3165,09
CV (%)	24,81	27,05	27,05	17,62	68,13
P	0,473	0,379	0,353	0,509	0,390

ALT: alanina aminotransferase (IU/L); AST: aspartato aminotransferase (IU/L); LDH: lactato desidrogenase (U/L); GGT: Gamma glutamiltransferase (IU/L); CPK: creatinofosfoquinase (U/L); CN: controle negativo (sem inclusão de aditivo alimentar); CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol®); BS: *B. subtilis* (GutCare®); EPM: erro padrão da média; CV (%): coeficiente de variação; P: probabilidade estatística; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A ausência de diferenças entre os constituintes bioquímicos e enzimáticos nas aves submetidas aos diferentes tratamentos indica que a utilização dos aditivos alimentares não influenciou o metabolismo hepático, renal e muscular das aves, comprovando que os



probióticos não promovem toxicidade ao organismo e, logo, podem ser utilizados com segurança na alimentação das aves.

Os parâmetros bioquímicos e enzimáticos são importantes índices para avaliação do metabolismo de nutrientes e da saúde das aves (LIU et al., 2016). As proteínas séricas e a albumina são componentes utilizados para avaliação da funcionalidade dos hepatócitos. Além disso, o acelerado ciclo de produção de frangos de corte pode influenciar esse parâmetro, porque as proteínas séricas têm um importante papel na formação da musculatura e deposição de proteína no animal (TÓTHOVÁ et al., 2019; AHMAT et al., 2021).

O AU é um marcador do catabolismo proteico e função renal (NAHAVANDINEJAD et al., 2014). Como indicador de metabolismo lipídico, foram avaliados o COL e os TRI. A GLI é uma importante fonte de energia para as células e está positivamente relacionada com a taxa de crescimento (AHMAT et al., 2021). A glicose sérica com a adição dos aditivos alimentares manteve-se entre 275,84 e 282,06 mg/dL, dentro da faixa de valores ideais (entre 181 e 325 mg/dL) (NUNES et al., 2018) para aves saudáveis.

Os níveis de AST e ALT são utilizados como indicadores de avaliação de hepatotoxicidade ou lesão hepática (TOGHYANI et al., 2011), e seus resultados estão dentro da faixa de normalidade para aves (NUNES et al., 2018). Entretanto, diferentes resultados foram observados por Qing et al. (2017), que perceberam uma queda AST e ALT com adição de probióticos de *Bacillus* na alimentação de frangos desafiados com EN, indicando função de proteção hepática do probiótico. Hussein et al. (2020b) também observaram queda de ALT em frangos desafiados com EN e alimentados com *B. subtilis* ou *B. licheniformis*. Os demais parâmetros (ALB, PT, AST e COL) se mantiveram iguais em todos os tratamentos avaliados. Al-Baadani et al. (2018), ao avaliarem os parâmetros bioquímicos do sangue com a adição de um probiótico de *B. subtilis* em aves desafiadas com *C. perfringens*, não observaram alteração PT, ALB, GLI e TRI, mas o COL foi reduzido.

As razões para a discrepância nos valores bioquímicos séricos em frangos de corte alimentados com probióticos de *Bacillus* são desconhecidas, no entanto, a diferença pode estar relacionada às características únicas das cepas e às concentrações de probióticos de *Bacillus* testados.

Para morfometria intestinal no duodeno e jejuno, foi observado um comprimento maior das vilosidades ( $P < 0,0001$ ) em frangos alimentados com dietas contendo CP, BA e BS quando comparados ao CN (Tabelas 8 e 9, respectivamente). A relação vilo:cripta no duodeno não apresentou diferença para nenhum dos tratamentos ( $p = 0,640$ ) (Tabela 8). Em adição, foi

observada uma área de absorção maior no duodeno para as aves dos tratamentos CP e BS ( $P < 0,0001$ ), e BA apresentou efeito intermediário ( $P < 0,0001$ ).

No jejuno, o CP apresentou maior relação vilosidade:cripta em comparação com CN, sendo similar ao grupo que recebeu BA e BS ( $P = 0,04$ ). A área de absorção no jejuno foi maior para CP, BA e BS em comparação ao CN ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 9).

Tabela 8. Morfometria intestinal do duodeno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com *Eimeria* vacinal e *C. perfringens* e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamentos	Duodeno			
	AV ( $\mu\text{m}$ )	PC ( $\mu\text{m}$ )	V:C	AA ( $\mu\text{m}^2$ )
CN	1508 <sup>b</sup>	162	9,77	15,14 <sup>c</sup>
CP	1898 <sup>a</sup>	201	9,84	19,86 <sup>a</sup>
BA	1866 <sup>a</sup>	193	9,92	16,44 <sup>bc</sup>
BS	1857 <sup>a</sup>	209	8,98	17,68 <sup>b</sup>
EPM	123,69	38,78	1,80	1,97
CV (%)	6,92	20,19	18,67	11,39
P	0,0001	0,069	0,640	0,0001

AV: altura de vilosidade; PC: profundidade de cripta; V:C: razão entre altura das vilosidades e profundidade das criptas; AA: área de absorção; CN: controle negativo; CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol<sup>®</sup>); BS: *B. subtilis* (GutCare<sup>®</sup>); EPM: erro padrão médio; CV (%): coeficiente de variação; P: probabilidade estatística; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 9. Morfometria intestinal do jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com *Eimeria* vacinal e *C. perfringens* e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamentos	Jejuno			
	AV ( $\mu\text{m}$ )	PC ( $\mu\text{m}$ )	V:C	AA ( $\mu\text{m}^2$ )
CN	615 <sup>b</sup>	95 <sup>c</sup>	6,31 <sup>b</sup>	6,60 <sup>b</sup>
CP	950 <sup>a</sup>	124 <sup>b</sup>	7,84 <sup>a</sup>	9,50 <sup>a</sup>
BA	1052 <sup>a</sup>	182 <sup>a</sup>	6,74 <sup>ab</sup>	9,54 <sup>a</sup>
BS	916 <sup>a</sup>	132 <sup>b</sup>	7,03 <sup>ab</sup>	10,55 <sup>a</sup>
EPM	121,95	23,04	1,16	1,17
CV (%)	13,97	18,16	16,57	13,07
P	0,0001	0,0001	0,040	0,0001

AV: altura de vilosidade; PC: profundidade de cripta; VC: razão entre altura das vilosidades e profundidade das criptas; AA: área de absorção; CN: controle negativo; CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol<sup>®</sup>); BS: *B. subtilis* (GutCare<sup>®</sup>); EPM: erro padrão médio; CV (%): coeficiente de variação; P: probabilidade estatística; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A altura das vilosidades e a relação V:C são um parâmetro importante para verificar a saúde intestinal das aves e sua resiliência frente a doenças entéricas. Quanto maior a vilosidade,

maior é a funcionalidade e a maturidade dos enterócitos e maior também é a área de superfície para absorção de nutrientes (SAMANYA e YAMAUCHI, 2002; XU et al., 2003; SEN et al., 2012; JAYARAMAN et al., 2013).

Ramlucken et al. (2020) e Lei et al. (2015) perceberam que o uso de probióticos de *Bacillus* promoveu uma maior altura nas vilosidades intestinais, aumentando a área de superfície e favorecendo a absorção de nutrientes. Da mesma maneira, Sokale et al. (2019), Ma et al. (2018) e Jayaraman et al. (2013) também observaram que a suplementação probiótica com *Bacillus* melhorou a altura das vilosidades em frangos desafiados com EN.

Em contraste, Kan et al. (2021) reportaram que assim como o desempenho, a adição de *B. licheniformis* na dieta de frangos de corte com EN não teve melhora na altura das vilosidades, profundidade da cripta ou mesmo na relação vilo:cripta, contudo, o escore de lesão intestinal foi reduzido na presença do probiótico. Logo, um maior aproveitamento de nutrientes promove maior desempenho, sugerindo a existência de uma relação positiva entre o GPM e CA com as alterações morfométricas observadas a partir do uso de probióticos de *Bacillus* na alimentação das aves.

A EN promove alterações morfométricas, que variam do encurtamento das vilosidades e maior profundidade das criptas, até um aumento na descamação da mucosa e processos inflamatórios, o que, conseqüentemente, causa má absorção de nutrientes e baixo desempenho nas aves (XU et al., 2003; SEN et al., 2012; DENG et al., 2012). Entretanto, o uso de probióticos minimiza esses efeitos em desafios de EN. Em nosso estudo, sugere-se que as bactérias probióticas atuam competindo com o patógeno *C. perfringens* em sítios de adesão na mucosa intestinal, dessa forma evitando danos à função de barreira, além de promover maior disponibilidade de nutrientes a partir do estímulo de enzimas digestivas (GIANNENAS et al., 2012; YANG et al., 2017; BORDA-MOLINA et al., 2018).

Aos 28 dias, os frangos desafiados com *Eimeria* tiveram seu escore de lesão aumentado ( $P < 0,001$ ) para 1,30 (presença de estrias ou petéquias na mucosa) em uma escala de 0 a 4 (JOHNSON e REID, 1970) (Tabela 10). Essa condição foi totalmente recuperada pela suplementação com os probióticos BA, BS e o antibiótico enramicina, que melhorou o escore de lesões das aves (escore 0). Para os tratamentos com aditivos alimentares, não foram detectadas diferenças entre a enramicina e os probióticos.

Frente aos resultados encontrados para o desafio com *Eimeria*, sugere-se que a redução nas lesões intestinais pode ser parcialmente explicada pela diminuição de oocistos de coccidiose na presença de probióticos, conseqüentemente, reduzindo os danos ao epitélio e o extravasamento de nutrientes para o lumén.

Tabela 10. Média do escore de lesão intestinal de frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com *Eimeria* vacinal e alimentados com dietas suplementadas com probióticos *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamento	<i>Eimeria</i> vacinal
CN	1,30 <sup>a</sup>
CP	0,20 <sup>b</sup>
BA	0,00 <sup>b</sup>
BS	0,00 <sup>b</sup>
P	0,0001

CN: controle negativo; CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol<sup>®</sup>); BS: *B. subtilis* (GutCare<sup>®</sup>); P: probabilidade de significância; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Dunn a 5%.

As infecções entéricas são causadas por patógenos que dominam a superfície da mucosa intestinal, interrompendo assim o equilíbrio da microbiota. Uma característica benéfica dos probióticos é sua capacidade de aderência ao revestimento do epitélio intestinal, aumentando o tempo de permanência do probiótico no trato gastrointestinal, o que exclui patógenos por meio da competição e antagonismo, resultando em maior absorção de nutrientes pelas aves (ABD EL-HACK et al., 2020). Como a suplementação probiótica reduziu a gravidade das lesões intestinais na mucosa, isso pode estar refletido na morfometria intestinal do duodeno e jejuno, onde foi observada maior altura das vilosidades e área de absorção em comparação com o tratamento CN, mantendo a integridade e a funcionalidade da barreira epitelial e melhorando os mecanismos digestivos de absorção de nutrientes.

Farhat-Khemakhem et al. (2018), em um estudo *in vitro*, mostraram que a cepa de *B. amyloliquefaciens* tem uma alta aderência à mucosa intestinal e à capacidade de formar biofilmes. Essas características conferem proteção contra patógenos, possivelmente criando uma barreira que impediu a forma infectante de *Eimeria* spp. de invadir os enterócitos e causar danos à mucosa intestinal.

Wang et al. (2021) verificaram os benefícios do *B. subtilis* de minimizar os efeitos negativos da EN em frangos de corte ao reduzir as lesões intestinais e aumentar a relação entre altura das vilosidades e profundidade das criptas. Ainda, segundo os autores, o probiótico diminuiu a expressão do gene Muc-2, possivelmente reduzindo a secreção de muco o que reduz a fonte de nutrientes de *C. perfringens*, diminuindo sua adesão à mucosa, proporcionando, desse modo, um efeito preventivo contra o EN.

Na avaliação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os frangos suplementados com BA apresentaram maior concentração de ácido butírico no ceco (P=0,004) frente aos demais tratamentos, inclusive ao antibiótico enramicina. Para os demais AGCC testados não houve

diferença entre os tratamentos com e sem a presença dos aditivos alimentares ( $P>0,05$ ) (Tabela 11).

Tabela 11. Ácidos graxos de gadeia curta ( $\text{mmol kg}^{-1}$ ) em frangos de corte, aos 28 dias de idade, desafiados com *Eimeria* vacinal e *C. perfringens* e alimentados com dietas suplementadas com probióticos de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e antibiótico enramicina

Tratamento	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido isobutírico	Ácido butírico	Ácido isovalérico	Ácido valérico
CN	34,298	2,610	0,052	4,267 <sup>b</sup>	0,192	0,393
CP	29,219	2,702	0,049	3,882 <sup>b</sup>	0,069	0,255
BA	31,348	2,302	0,227	6,918 <sup>a</sup>	0,247	0,400
BS	32,348	2,565	0,085	4,562 <sup>b</sup>	0,125	0,316
EPM	8,41	0,72	0,11	1,51	0,15	0,16
CV (%)	26,45	28,03	105,79	23,27	94,73	46,27
P	0,814	0,895	0,064	0,004	0,297	0,439

CN: controle negativo; CP: controle positivo (enramicina 8%); BA: *B. amyloliquefaciens* (Ecobiol<sup>®</sup>); BS: *B. subtilis* (GutCare<sup>®</sup>); EPM: erro padrão médio; CV (%): coeficiente de variação; P: probabilidade estatística; <sup>ab</sup>: médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A microbiota intestinal é complexa e tem papel importante no desempenho e na saúde intestinal das aves. As bactérias que a compõe têm a capacidade de produzir metabólitos, como os AGCC, que desempenham função fundamental na manutenção da homeostase no trato gastrointestinal. A produção de AGCC ocorre a partir da fermentação (hidrólise) de carboidratos indigeríveis (celulose, amido e polissacarídeos não amiláceos). A presença desses ácidos melhora o desenvolvimento das vilosidades, a morfologia intestinal, a função de barreira das células epiteliais e a modulação do sistema imunológico (QU et al., 2008; REHMAN et al., 2007; DEN BESTEN et al., 2013; CLAVIJO; FLÓREZ, 2018; LIAO et al., 2020).

Segundo Dittoe et al. (2018), a proporção de bactérias do filo Firmicutes e Bacteroidetes na microbiota intestinal tornou-se um índice de avaliação que correlaciona o desempenho zootécnico com a microbiota saudável em aves. Logo, uma infecção por *C. perfringens* pode causar disbiose na microbiota gastrointestinal das aves, que, conforme Bortoluzzi et al. (2019), causa aumento na abundância de bactérias do filo Bacteroidetes e redução na abundância de bactérias do filo Firmicutes.

Entretanto, estudos de Ma et al. (2019), Whelan et al. (2019) e Hong et al. (2019) demonstraram que probióticos de *Bacillus* têm a capacidade de regular a proporção de Firmicutes/Bacteroidetes no ceco, resultando em uma maior fermentação de AGCC, que favorece a microbiota benéfica e promove maior absorção e utilização de nutrientes em frangos de corte, o que pode explicar parcialmente os efeitos do probiótico na maior concentração de

ácido butírico, bem como no desempenho e morfometria intestinal das aves. Ainda, segundo Hong et al. (2019), o gênero *Faecalibacterium* (Firmicutes) identificado em seu estudo é capaz de produzir butirato via butiril-CoA:acetato CoA-transferase com consumo líquido de acetato e a partir de fontes de energia provenientes de carboidratos não digeríveis.

Outra via de atuação do *B. amyloliquefaciens* ocorre a partir do rápido consumo de oxigênio, fornecendo um ambiente favorável para a colonização de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (LI et al., 2018). Bao et al. (2022) observaram uma maior abundância relativa de *Lactobacillus* (Firmicutes) na digesta cecal de frangos alimentados com *B. amyloliquefaciens*. Os *Lactobacillus* são os principais produtores de ácido láctico, os quais podem ser convertidos em butirato. O butirato produzido pelo metabolismo microbiano do intestino pode diminuir o pH do intestino, o que, por sua vez, cria um ambiente que não é propício ao crescimento de microorganismos nocivos (TSUKAHARA et al., 2002; BAO et al., 2022). Como *C. perfringens* é altamente sensível ao pH reduzido (abaixo de 5), possivelmente a adição de *B. amyloliquefaciens* na dieta de aves reduziu a incidência dessas cepas no lumén intestinal (GUO et al., 2017; SHANMUGASUNDARAM et al., 2020).

Consistente com nossas investigações, Aljumaah et al. (2020) demonstraram que a adição de uma cepa de *Bacillus* na ração dos frangos aumentou a concentração de ácido butírico contribuindo para a prevenção de EN. Ainda, Leeson et al (2005) e Timbermont et al. (2010) perceberam que a presença de ácido butírico é um bom indicativo de resistência frente a desafios com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. em aves.

Em vista disso, sugere-se que o probiótico BA atua modulando a microbiota intestinal (KOUHOUNDE et al., 2022; AYALEW et al. 2022) e favorecendo a proliferação de bactérias benéficas, o que pode explicar uma maior produção de ácido butírico encontrada.

Em meio aos benefícios diretos e indiretos do ácido butírico no trato gastrointestinal das aves, podemos citar: a melhora na conversão de energia pelas células, a supressão de doenças inflamatórias intestinais, a função imunológica, a função da barreira epitelial do intestino, a produção de mucina para manutenção da permeabilidade do epitélio intestinal, a modulação da microbiota intestinal, a redução no número de patógenos (PANDA et al., 2009; ZHANG et al., 2018; LIAO et al., 2020; XU et al., 2021; MÁTIS et al., 2022), a proliferação e diferenciação de células epiteliais e o melhor desenvolvimento e altura das vilosidades (QAISRANI et al. 2015).

### 3.4 Conclusão

O modelo de desafio experimental proposto neste estudo foi capaz de induzir a um quadro de enterite, sendo observada interferência negativa no desempenho, no rendimento de carcaça e cortes e na morfometria e escore de lesão intestinal.

A adição dos probióticos de *B. amilolyquefaciens* e *B. subtilis* na dieta das aves desafiadas com *C. perfringens* e *Eimeria* vacinal mostraram-se eficazes em substituir o antibiótico enramicina, com melhora no desempenho e conversão alimentar das aves de 1 a 42 dias de idade, rendimento de carcaça e filé de peito, aumento na altura das vilosidades e área de absorção no duodeno e jejuno, redução no escore de lesão intestinal e melhora na concentração de ácido butírico (*B. amilolyquefaciens*), sem alterar o metabolismo sérico, hepático e renal das aves.

### 3.5 Referências

- ABD EL-HACK, M.E.; EL-SAADONY, M.T.; ELBESTAWY, A.R. et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives - a comprehensive review. **Poultry science**, v.101., n.2, p.101590, 2022.
- ABDEL-RAHEEM, S.M.; ABD-ALLAH, S.M. The effect of single or combined dietary supplementation of mannan oligosaccharide and probiotics on performance and slaughter characteristics of broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.10, n.11, p.854-862, 2011.
- ADHIKARI, P.; KIESS, A.; ADHIKARI, R. et al. An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. **Journal of applied poultry research**, v.29, n.2, p.515-534, 2020.
- AHMAT, M.; CHENG, J.; ABBAS, Z. et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* LFB112 on growth performance, carcass traits, immune, and serum biochemical response in broiler chickens. **Antibiotics**, v.10, n.11, p.1427, 2021.
- AHMED, S.T.; ISLAM, M.; MUN, H.S. et al. Effects os *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora anda fecal noxious gas emissions of broiler checkens. **Poultry Science**, v.93, p.1963-1971, 2014.
- AL-BAADANI, H.H.; ABUDABOS, A.M.; AL-MUFARREJ, S.I. et al. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and their symbiotic effect on serum biochemical parameters in broilers challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal Of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 1064-1072, 2018.
- ALJUMAAH, M.R.; ALKHULAIIFI, M.M.; ABUDABOS, A.M. et al. *Bacillus subtilis* PB6 based probiotic supplementation plays a role in the recovery after the necrotic enteritis challenge. **PloS one**, v.15, n.6, p.e0232781, 2020.

- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical chemistry**, v. 20, n. 4, p.470-475, 1974.
- AYALEW, H., ZHANG, H., WANG, J. et al. Potential feed additives as antibiotic alternatives in broiler production. **Frontiers in Veterinary Science**, v.9, p.1-15, 2022.
- BAJAGAI, Y.S.; KLIEVE, A.V.; DART, P.J. et al. **Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation**. Roma: World Health Organization (WHO), 2016. 108p.
- BAO, C.; ZHANG, W.; WANG, J. et al. The Effects of Dietary *Bacillus amyloliquefaciens* TL106 Supplementation, as an Alternative to Antibiotics, on Growth Performance, Intestinal Immunity, Epithelial Barrier Integrity, and Intestinal Microbiota in Broilers. **Animals**, v. 12, n. 22, p. 3085, 2022.
- BIAGINI, L.; GALOSI, L.; RONCARATI, A. et al. The role of nutraceuticals and phytonutrients in chickens' gastrointestinal diseases. **Animals**, v.12, n.7, p.1-21, 2022.
- BORDA-MOLINA, D.; SEIFERT, J.; CAMARINHA-SILVA, A. Current perspectives of the chicken gastrointestinal tract and its microbiome. **Computational and structural biotechnology journal**, v.16, p.131-139, 2018.
- BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B.S.; HOFACRE, C. et al. Effect of different challenge models to induce necrotic enteritis on the growth performance and intestinal microbiota of broiler chickens. **Poultry Science**, v.98, n.7, p.2800-2812, 2019.
- CALY, D.L.; D'INCA, R.; AUCLAIR, E. et al. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist's perspective. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1336, 2015.
- CAO, G.T.; ZHAN, X.A.; ZHANG, L.L. et al. Modulation of broilers' caecal microflora and metabolites in response to a potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 102, n. 2, p. e909-e917, 2018.
- CLAVIJO, V.; FLÓREZ, M.J.V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. **Poultry science**, v. 97, n. 3, p. 1006-1021, 2018.
- DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A.K. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of lipid research**, v.54, n.9, p.2325-2340, 2013.
- DENG, W.; DONG, X.F.; TONG, J.M. et al. The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. **Poultry science**, v.91, n.3, p.575-582, 2012.
- DITTOE, D.K.; RICKE, S.C.; KIESS, A.S. Organic acids and potential for modifying the avian gastrointestinal tract and reducing pathogens and disease. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 216, 2018.
- DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G. **Determination of sérum albumin**. Standard Methods of Clinical Chemistry. Academic Press N.Y., 1972.
- FARHAT-KHEMAKHEM, A.; BLIBECH, M.; BOUKHRIS, I. et al. Assessment of the potential of the multi-enzyme producer *Bacillus amyloliquefaciens* US573 as alternative



- feed additive. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.98, n.3, p.1208-1215, 2018.
- FATHIMA, S.; HAKEEM, W.; SHANMUGASUNDARAM, R. et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: a review on the pathogen, pathogenesis, and prevention. **Microorganisms**, v.10, n.10, p.1-31, 2022.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with An enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v.28, n.10, p.2077-2080, 1982.
- GAVA, Marta Silvia Gava. Metodologia de morfometria intestinal de frangos de corte. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.
- GADDE, U.; KIM, W.; OH, S.T. et al. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. **Animal health research reviews**, v. 18, n. 1, p. 26-45, 2017a.
- GIANNENAS, I.; PAPADOPOULOS, E.; TSALIE, E. et al. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. **Veterinary parasitology**, v.188, n.1-2, p.31-40, 2012.
- GUO, S.; LIU, D.; ZHANG, B. et al. Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and  $\alpha$ -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells in vitro. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2081, 2017.
- HERNANDEZ-PATLAN, D.; SOLIS-CRUZ, B.; PONTIN, K.P. et al. Impact of a *Bacillus* direct-fed microbial on growth performance, intestinal barrier integrity, necrotic enteritis lesions, and ileal microbiota in broiler chickens using a laboratory challenge model. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, p.1-11, 2019.
- HOFACRE, C.L.; SMITH, J.A.; MATHIS, G.F. An optimist's view on limiting necrotic enteritis and maintaining broiler gut health and performance in today's marketing, food safety, and regulatory climate. **Poultry science**, v.97, n.6, p.1929-1933, 2018.
- HONG, Y.; CHENG, Y.; LI, Y. et al. Preliminary study on the effect of *Bacillus amyloliquefaciens* TL on cecal bacterial community structure of broiler chickens. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- HONG, H. A.; KHANEJA, R.; TAM, N.M. et al. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. **Research in microbiology**, v.160, n.2, p.134-143, 2009.
- HOSSAIN, M.M.; BEGUM, M.; KIM, I.H. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. **Veterinarni Medicina**, v.60, n.2, p.77-86, 2015.
- HOU, L.; SUN, B.; YANG, Y. Effects of added dietary fiber and rearing system on the gut microbial diversity and gut health of chickens. **Animals**, v.10, n.1, p. 1-22, 2020.
- HUSSEIN, E., AHMED, S.H., ABUDABOS, A.M. et al. Ameliorative effects of antibiotic-, probiotic- and phytobiotic-supplemented diets on the performance, intestinal health, carcass traits, and meat quality of *Clostridium perfringens*-infected broilers. **Animals**, v.10, n.4, p.1-14, 2020a.

- HUSSEIN, E.; AHMED, S.H.; ABUDABOS, A.M. et al. Effect of Antibiotic, Phytobiotic and Probiotic Supplementation on Growth, Blood Indices and Intestine Health in Broiler Chicks Challenged with *Clostridium perfringens*. **Animals**, v.10, n.3, p.1-18, 2020b.
- ISMAIL, I.; JOO, S. Poultry meat quality in relation to muscle growth and muscle fiber characteristics. **Korean journal for food science of animal resources**, v. 37, n. 6, p. 873, 2017.
- JAYARAMAN, S.; THANGAVEL, G.; KURIAN, H. et al. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. **Poultry science**, v.92, n.2, p.370–374, 2013.
- JEON, H.; LEE, N.K.; YANG, S.J. et al. Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. **Food science and biotechnology**, v. 26, p. 1641-1648, 2017.
- JHA, R.; DAS, R.; OAK, S. et al. Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: a systematic review. **Animals**, v.10, n.10, p.1-18, 2020.
- JOHNSON, J; REID, W.M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, v.28, p.30-36, 1970.
- KAN, L.; GUO, F.; LIU, Y. et al. Probiotics *Bacillus licheniformis* improves intestinal health of subclinical necrotic enteritis-challenged broilers. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 623739, 2021.
- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A. et al. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v.2, p.131–135, 2002.
- KIU, R.; HALL, L.J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. **Emerging microbes & infections**, v.7, n.1, p.1-15, 2018.
- KONIECZKA, P.; NOWICKA, K.; MADAR, M. et al. Effects of pea extrusion and enzyme and probiotic supplementation on performance, microbiota activity and biofilm formation in the broiler gastrointestinal tract. **British poultry science**, v. 59, n. 6, p. 654-662, 2018.
- KOUHOUNDE, S.; ADÉOTI, K.; MOUNIR, M. et al. Applications of probiotic-based multi-components to human, animal and ecosystem health: concepts, methodologies, and action mechanisms. **Microorganisms**, v.10, n.9, p.1-31, 2022.
- KULKARNI, R.R.; GAGHAN, C.; GORRELL, K. et al. Probiotics as alternatives to antibiotics for the prevention and control of necrotic enteritis in chickens. **Pathogens**, v.11, n.6, p.1-20, 2022.
- LARSEN, N.; THORSEN, L.; KPIKPI, E.N. et al. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1105–1118, 2014.
- LEESON, S.; NAMKUNG, H.; ANTONGIOVANNI, M. et al. Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. **Poultry science**, v.84, n.9, p.1418-1422, 2005.
- LEI, X.; PIAO, X.; RU, Y. et al. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora

- in broiler chickens. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v.28, n.2, p.239-246, 2015.
- LI, Y.; ZHANG, H.; SU, W. et al. Effects of dietary *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation on growth performance, intestinal morphology, inflammatory response, and microbiota of intra-uterine growth retarded weanling piglets. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2018.
- LIAO, X.; SHAO, Y.; SUN, G. et al. The relationship among gut microbiota, short-chain fatty acids, and intestinal morphology of growing and healthy broilers. **Poultry science**, v.99, n.11, p.5883-5895, 2020.
- LISBOA, M.P.; BONATTO, D.; BIZANI, D. et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 111-118, 2006.
- LIU, Q.W.; FENG, J.H.; CHAO, Z. et al. The influences of ambient temperature and crude protein levels on performance and serum biochemical parameters in broilers. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.100, n.2, p.301-308, 2016.
- LUNA, L. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 3277 p.
- MA, Y.; WANG, W.; ZHANG, H. et al. Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 32315 manipulates intestinal structure and microbial composition in broiler chickens. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.1-13, 2018.
- MADLALA, T.; OKPEKU, M.; ADELEKE, M.A. Understanding the interactions between *Eimeria* infection and gut microbiota, towards the control of chicken coccidiosis: a review. **Parasite**, v.28, n.48, p.1-10, 2021.
- MÁTIS, G.; MACKEL, M.; BOOMSMA, B. et al. Dietary protected butyrate supplementation of broilers modulates intestinal tight junction proteins and stimulates endogenous production of short chain fatty acids in the caecum. **Animals**, v.12, n.15, p. 1-18, 2022.
- MAZANKO, M.S.; POPOV, I.V.; PRAZDNOVA, E.V. et al. Beneficial Effects of Spore-Forming *Bacillus* Probiotic Bacteria Isolated From Poultry Microbiota on Broilers' Health, Growth Performance, and Immune System. **Frontiers in Veterinary Science**, v.9, p.1-12, 2022.
- MEMON, F.U.; YANG, Y.; LEGHARI, I.H. et al. Transcriptome analysis revealed ameliorative effects of *Bacillus* based probiotic on immunity, gut barrier system, and metabolism of chicken under an experimentally induced *Eimeria tenella* infection. **Genes**, v.12, n.4, p.1-14, 2021.
- NAHAVANDINEJAD, M.; SEIDAVI, A., ASADPOUR, L. et al. Blood biochemical parameters of broilers fed differently thermal processed soybean meal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 19, n. 3, p. 4301-4315, 2014.
- NUNES, R.V.; BROCH, J.; WACHHOLZ, L. et al. Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. **Poultry science**, v.97, n.10, p.3746-3754, 2018.
- OLIVEIRA, M.J.K.; SAKOMURA, N.K.; DORIGAM, J.C.P. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 alone or in combination with antibiotic growth promoters

- improves performance in broilers under enteric pathogen challenge. **Poultry Science**, v.98, n.10, p.4391-4400, 2019.
- PANDA, A.K.; RAO, S.V.; RAJU, M.V.L.N. et al. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.22, n.7, p.1026-1031, 2009.
- PARK, I.; LEE, Y.; GOO, D. The effects of dietary *Bacillus subtilis* supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immunity, and epithelial barrier integrity in broiler chickens infected with *Eimeria maxima*. **Poultry Science**, v.99, n.2, p.725-733, 2020.
- PROPHET E.B., MILLS B., ARRINGTON J.B., SOBIN L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology - Armed Forces Institute of Pathology (AFIP)**. American Registry of Pathology, Washington, D.C., 1994.
- QAISRANI, S.N.; VAN KRIMPEN, M.M.; KWAKKEL, R.P. et al. Dietary factors affecting hindgut protein fermentation in broilers: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 71, n. 1, p. 139-160, 2015.
- QING, X.; ZENG, D.; WANG, H. et al. Preventing subclinical necrotic enteritis through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by ameliorating lipid metabolism and intestinal microflora in broiler chickens. **AMB Express**, v.7, n.1, p.1-12, 2017.
- QU, A.; BRULC, J.M.; WILSON, M.K. et al. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. **PloS one**, v.3, n.8, p.e2945, 2008.
- RAHMAN, M.; FLISS, I.; BIRON, E. Insights in the development and uses of alternatives to antibiotic growth promoters in poultry and swine production. **Antibiotics**, v.11, n.6, p.1-29, 2022.
- RAMLUCKEN, U.; RAMCHURAN, S.O.; MOONSAMY, G. et al. A novel *Bacillus* based multi-strain probiotic improves growth performance and intestinal properties of *Clostridium perfringens* challenged broilers. **Poultry science**, v.99, n.1, p.331-341, 2020.
- RATHNAPRABA, S.; KANAGARAJU, P.; VIJAYARANI, K. Effect of dietary supplementation of probiotic and BMD on the growth performance of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis. **International Journal of Chemical Studies**, v.6, p.13-15, 2018.
- REHMAN, H.U.; VAHJEN, W.; AWAD, W.A. Et al. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Archives of animal nutrition**, v.61, n.5, p.319-335, 2007.
- RIFAI, N.; HORVATH, A.R.; WITTEWER, C.T. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018.
- RIPERT, G.; RACEDO, S.M.; ELIE, A.M. et al. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain o/c inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.6, p.3445-3454, 2016.
- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., HANNAS, M.I. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. (Ed.) ROSTAGNO, H.S. Viçosa: UFV, 252p, 2017.

- SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2016, p. 262.
- SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.133, n.1, p.95-104, 2002.
- SANDVANG, D.; SKJOET-RASMUSSEN, L.; CANTOR, M.D. et al. Effects of feed supplementation with 3 different probiotic *Bacillus* strains and their combination on the performance of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Poultry Science**, v.100, n.4, p.1-10, 2021.
- SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of aspartate-aminotransferase [L-aspartate: 2-oxoglutarate-aminotransferase (AST), EC 2.6.1.1]. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.40, n.7, p.725-733, 2002a.
- SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of alanine aminotransferase [L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase (ALT), EC 2.6.1.2]. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.40, n.7, p.718-724, 2002b.
- SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of  $\gamma$ -glutamyltransferase [( $\gamma$ -glutamyl)-peptide: amino acid  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT), EC 2.3.2.2]. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.40, n.7, p.734-738, 2002c.
- SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 3. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Lactate Dehydrogenase. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.40, n.7, p.643-648, 2002d.
- SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 2. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Creatine Kinase. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.40, n.7, p.635-642, 2002e.
- SEN, S.; INGALE, S.L.; KIM, Y.W. et al. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in Veterinary Science**, v.93, n.1, p.264-268, 2012.
- SHANMUGASUNDARAM, R.; MARKAZI, A.; MORTADA, M. et al. Research Note: Effect of synbiotic supplementation on caecal *Clostridium perfringens* load in broiler chickens with different necrotic enteritis challenge models. **Poultry science**, v. 99, n. 5, p. 2452-2458, 2020.
- SHIRISHA, R.; RAJU, M.V.L.N.; REDDY, S.S. et al. Effect of dietary supplementation of probiotic (problend) on Immune Status, biochemical profile and *E. coli* counts in commercial broiler chicken. **Journal of Animal Research**, v.7, n.4, p.717-721, 2017.

- SOKALE, A.O.; MENCONI, A.; MATHIS, G.F. et al. Effect of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the intestinal structural integrity and growth performance of broiler chickens under necrotic enteritis challenge. **Poultry science**, v. 98, n. 11, p. 5392-5400, 2019.
- SUN, Y.; ZHANG, Y.; LIU, M. et al. Effects of dietary *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 supplementation on growth performance, antioxidant status, immunity, and digestive enzyme activity of broilers fed corn-wheat-soybean meal diets. **Poultry Science**, v. 101, n. 2, p. 101585, 2022.
- TESSERAUD, S.; MAAA, N.; PERESSON, R. et al. Relative responses of protein turnover in three different skeletal muscles to dietary lysine deficiency in chicks. **British Poultry Science**, v. 37, n. 3, p. 641-650, 1996.
- TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; DEWULF, J. et al. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. **Avian Pathology**, v.39, n.2, p.117-121, 2010.
- TOGHYANI, M.; TOGHYANI, M.; GHEISARI, A. et al. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. **Livestock science**, v.138, n.1-3, p.167-173, 2011.
- TÓTHOVÁ, C.; SESZTÁKOVÁ, E.; BIELIK, B. et al. Changes of total protein and protein fractions in broiler chickens during the fattening period. **Veterinary world**, v.12, n.4, p.598-604, 2019.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of clinical Biochemistry**, v.6, n.1, p.24-27, 1969.
- TSUKAHARA, T.; KOYAMA, H.; OKADA, M., et al. Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 8, p. 2229-2234, 2002.
- ULYANOVA, V.; VERSHININA, V.; ILINSKAYA, O. Barnase and binase: twins with distinct fates. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 19, p. 3633-3643, 2011.
- VAN IMMERSEEL, F.; BUCK, J.D.; PASMANS, F. et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.
- WANG, Y.; XU, Y.; XU, S. et al. *Bacillus subtilis* DSM29784 alleviates negative effects on growth performance in broilers by improving the intestinal health under necrotic enteritis challenge. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 723187, 2021.
- WANG, X.; FARNELL, Y.Z.; KIESS, A.S. et al. Effects of *Bacillus subtilis* and coccidial vaccination on cecal microbial diversity and composition of *Eimeria*-challenged male broilers. **Poultry Science**, v.98, n.9, p.3839-3849, 2019.
- WHELAN, R.A.; DORANALLI, K.; RINTTILÄ, T. et al. The impact of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the pathology, performance, and intestinal microbiome of broiler chickens in a necrotic enteritis challenge. **Poultry science**, v.98, n.9, p.3450-3463, 2019.
- WU, Y.; SHAO, Y.; SONG, B. et al. Effects of *Bacillus coagulans* supplementation on the growth performance and gut health of broiler chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. **Journal of animal science and biotechnology**, v.9, n.1, p.1-14, 2018.

- WU, A.H.B. **Tietz clinical guide to laboratory test**. 4th ed. W.B. Saunders Company, 2006.
- XU, Y.; YU, Y.; SHEN, Y. et al. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers. **Poultry Science**, v.100, n.9, p. 1-11, 2021.
- XU, Z.R.; HU, C.H.; XIA, M.S. et al. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poultry Science**, v.82, p.1030-1036, 2003.
- YANG, J.J.; KUN, Q.I.A.N.; DONG, W.U. et al. Effects of different proportions of two *Bacillus* sp. on the growth performance, small intestinal morphology, caecal microbiota and plasma biochemical profile of Chinese Huainan Partridge Shank chickens. **Journal of integrative agriculture**, v.16, n.6, p.1383-1392, 2017.
- ZHANG, T.; YANG, Y.; LIANG, Y. et al. Beneficial effect of intestinal fermentation of natural polysaccharides. **Nutrients**, v.10, n.8, p. 1-22, 2018.