



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



ADRIANO SILVA NUNES

ÁCIDO CÍTRICO COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO PARA CODORNAS

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



ADRIANO SILVA NUNES

ÁCIDO CÍTRICO COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO PARA CODORNAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências do curso de Mestrado em Zootecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Discente : Adriano Silva Nunes

Orientador : Prfº Dr. Gregório Murilo de Oliveira Júnior

Co-orientadora: Prfª Dr.ª Ana Paula Del Vesco

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Nunes, Adriano Silva.
N972a Ácido cítrico como promotor de crescimento para codornas
/ Adriano Silva Nunes ; orientador Gregório Murilo de
Oliveira Júnior. – São Cristóvão, 2016.
57 f.: il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia)– Universidade
Federal de Sergipe, 2016.

1. Codorna. 2. Ácido cítrico. 3. Produção animal. 4.
Microbiologia. I. Oliveira Júnior, Gregório Murilo de, orient.
II. Título.

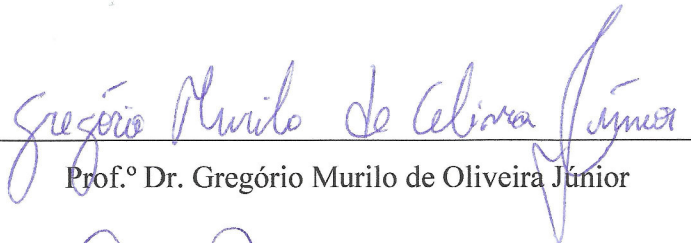
CDU 636.03

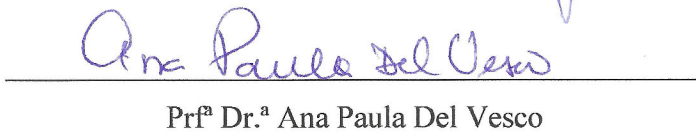
ADRIANO SILVA NUNES

ÁCIDO CÍTRICO COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO PARA CODORNAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências do curso de Mestrado em Zootecnia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 26 de julho de 2016.


Prof.º Dr. Gregório Murilo de Oliveira Júnior


Prfª Dr.ª Ana Paula Del Vesco


Dr.ª Cláudia da Costa Lopes


Prof.º Dr. Flávio Henrique Ferreira Barbosa

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2016

AGRADECIMENTOS

A força maior que rege a todos nós, por ter me dado condições de chegar onde estou;

Aos meus pais pelos esforços e sacrifícios sempre dando o seu melhor, sem medir consequências para assegurar o melhor para mim;

A minha esposa por ser sempre compreensiva e mesmo em minha ausência sempre estar ao meu lado;

Ao meu filho, que me direcionou para um novo rumo na vida;

A Universidade Federal de Sergipe (UFS) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PROZOOTEC) pela oportunidade de ingressar no curso e, por consequência, ampliar meus conhecimentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de realização do mestrado;

A meu orientador, por todo apoio e orientação, mas principalmente por aceitar o desafio de trabalhar com aves, depois de tantos contratempos acabou dando certo;

A minha co-orientadora, pelo apoio, orientação, força e conselhos nos momentos mais cruciais;

A granja VICAMI pela doação dos animais para realização do experimento;

A todos do NECC (Núcleo de Estudo de Codornas e Coelhos) e NEMAB (Núcleo de Estudo em Melhoramento Animal e Biotecnologia), sem os quais seria impossível a realização do experimento;

Aos amigos adquiridos na UFS durante a realização do mestrado;

A todos os professores do Departamento de Zootecnia (DZO) e do PROZOOTEC por todo ensinamento passado;

Aos coordenadores do programa, Gladston e Jailson (Ratinho) por serem sempre tão prestativos e acessíveis, além do empenho em solucionar os percalços surgidos durante o curso;

Ao secretário do programa, por toda ajuda na solução de problemas, orientação e agilidade na emissão de documentos;

Ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFS e ao Laboratório de Genética Molecular

de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo auxílio nas análises microbiológicas;

Ao Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais (DCEM), pela disponibilização de laboratório para análise de resistência óssea;

Aos técnicos e vigilantes do Campus Rural, e pessoal da Unidade de aquicultura (UNIAQUA) por todo suporte prestado, sem os quais não seria possível concluir o experimento;

Ao Programa de Estímulo a Mobilidade e ao Aumento da Cooperação Acadêmica da Pós-Graduação em Sergipe - PROMOB pelo apoio ao PROZOOTEC;

Aos membros da banca de qualificação e defesa, pelas sugestões importantíssimas para o enriquecimento do trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Origem e Importância das Codornas no Brasil e Mundo.....	3
2.2. Sistema e Processo Digestório	5
2.3. Relação entre Organismo e Microbiota	8
2.4. Uso de Antimicrobianos nas Rações	9
2.5. Ácido Cítrico Como Antimicrobiano.....	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
<i>CAPÍTULO I</i>	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
Experimento 1. Teste de Sensibilidade.....	25
Experimento 2. Uso do Ácido Cítrico Como Promotor de Crescimento Para Codornas de Postura	26
2.1. Local	26
2.2. Delineamento e Tratamentos Experimentais	26
2.3. Procedimentos Experimentais.....	26
2.4. Análises Microbiológicas	29
2.5. Expressão Gênica.....	33
2.6. Análise Estatística.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. Experimento 1. Teste de Sensibilidade.....	37
3.2. Experimento 2. Uso do Ácido Cítrico Como Promotor de Crescimento Para Codornas de Postura	37
4. CONCLUSÕES	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

NUNES, Adriano Silva. **Ácido cítrico como promotor de crescimento para codornas**. Sergipe: UFS, 2016. 21p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia)

RESUMO: Os estudos quanto ao uso de antimicrobianos naturais vêm sendo intensificados devido à possibilidade dos antimicrobianos químicos causarem resistência bacteriana em humanos. Dentre os antimicrobianos naturais destacam-se os ácidos orgânicos por exercerem efeitos similares aos antimicrobianos convencionais, estimulando pesquisas com o ácido cítrico por ser um dos potenciais antimicrobianos naturais. Relaciona-se também o crescente desafio sanitário em razão do modo de criação intensivo e o maior risco sanitário, tornando o uso de antimicrobianos necessário. Por isso, avaliar os efeitos de diferentes níveis de ácido cítrico como promotor de crescimento em dietas de codornas japonesas é essencial. Para isso, realizou-se um ensaio de sensibilidade para verificar se o ácido cítrico pode inibir o crescimento bacteriano de *Escherichia coli* e *Salmonella spp in vitro* e um teste a campo a fim de verificar seus efeitos sobre o desempenho de codornas japonesas, quantificar o crescimento bacteriano no trato digestivo, avaliar a influência do ácido cítrico sobre a expressão de genes relacionados ao transporte de nutrientes e à capacidade antioxidante intestinal; para então determinar o nível adequado de inclusão do ácido cítrico. O ensaio *in vitro* foi realizado utilizando três níveis de ácido cítrico (0,0; 0,6 e 1,2%) a fim de verificar sua influência sobre *Escherichia coli* e *Salmonella*. Verificou-se que estes níveis não exerceram influência sobre as mesmas. O ensaio de desempenho foi realizado utilizando 450 codornas com nove dias de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, dentro de cinco tratamentos, nove repetições e 10 aves por unidade experimental. As dietas foram isoenergéticas e isoprotéicas e cinco níveis de ácido cítrico foram testados: 0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2%. O experimento teve duração de 35 dias. O ácido cítrico influenciou o ganho de peso ($P=0,01$), a conversão alimentar ($P=0,05$) e a expressão dos genes *B⁰AT1* ($P=0,01$), *SGLT1* ($P=0,01$), *GPX 7* ($P=0,01$) e *SOD* ($P=0,01$). Conclui-se que o ácido cítrico não inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* em ensaios *in vitro*; entretanto, melhora a expressão do transportador de aminoácidos e cotransportador sódio-glicose 1. O melhor nível de ácido cítrico em dietas para codornas de postura em crescimento é de 0,60%.

Palavras chave: Antimicrobiano; aves; expressão gênica; microbiologia; produção animal

ABSTRACT

NUNES, Adriano Silva. **Citric acid as a growth promoter for quail**. Sergipe: UFS, 2016. 57p. (Dissertation - Master Degree in Animal Science)

ABSTRACT: The studies about the use of antimicrobials has been intensified, due to the possibility of these antimicrobials being the cause of bacterial tolerance in human beings that consume products of animal origin. The organic acids stand out among the natural antimicrobials, performing similar effects to conventional antimicrobials. Although, the citric acid stands out as a potential natural antimicrobial. Because the coturniculture follow the same trend of the poultry industry, which is growing, to keep production levels in farming systems to meet the market demand, the use of antimicrobials is necessary. Therefore, it is necessary to evaluate the effects of different levels of citric acid as a growth promoter in Japanese quail diets. To achieve this, a sensibility analysis was realized to verify if citric acid has the capacity to inhibit the bacterial growth of *Escherichia coli* and *Salmonella spp* in vitro, and a field test to further examine its effects on the Japanese Quails' digestive tract bacterial growth, evaluate the impact the citric acid has on the manifestation of genes related to nutrients transportation, and intestinal antioxidant capacity; so that the adequate level of citric acid integration can be determined. The in vitro testing was realized utilizing three levels of citric acid (0,0%; 0,6% and 1,2%) to verify its impact on *Escherichia coli* and *Salmonella spp*, which was none. The performance test was realized utilizing 450 nine days old quails divided in total random design with five treatments, nine iterations and 10 birds per unit. Was inert added so to keep the diets isoenergetic and isoproteic getting five levels of citric acid: 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; and 1,2%. The trials spanned 35 days and the testing protocols were approved by the ethics committee. The citric acid had a impact on growth ($P=0,01$), feed conversion ($P=0,05$), as well as manifestation of the genes *SGLT1* ($P=0,01$), *GPX7* ($P=0,01$), and *SOD* ($P=0,01$). In conclusion, the citric acid did not inhibit *Escherichia coli* and *Salmonella spp* growth in the in vitro tests; improves the manifestation of aminoacids transporter and Sodium-glucose cotransporter 1. The best citric acid level for growing laying quails diet is of 0,60%.

Keywords: Antimicrobial; birds; gene expression; microbiology; animal production

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Composição calculada das dietas experimentais.....	27
Tabela 2- Reação de PCR-ARDRA 16S-23S rRNA.....	32
Tabela 3- Programação Termociclador MJ Research.....	32
Tabela 4- Sequências de primers utilizados nas reações de qRT - PCR	35
Tabela 5- Desempenho de codornas japonesas em função dos níveis de ácido cítrico durante o período experimental.....	38
Tabela 6- Efeito da suplementação de ácido cítrico sobre a expressão gênica no intestino de codornas.....	39
Tabela 7- Peso relativo das vísceras, pH do ceco, comprimento intestinal e resistência óssea.....	41
Tabela 8- Microbiologia relacionada ao jejuno e ceco em função dos tratamentos.....	42

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 01. Ganho de peso das codornas em função dos níveis de ácido cítrico na dieta durante o período experimental.....	38
Figura 02. Peso do fígado em função dos níveis de ácido cítrico.....	40
Figura 03. Comprimento do intestino delgado em função dos níveis de ácido cítrico.....	41
Figura 04. Perfil eletroforético dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, das regiões intergênicas 16S-23S do rDNA de <i>Lactobacillus</i> , em gel de agarose 1,4%.....	45
Figura 05. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	47
Figura 06. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. <i>Lactobacillus salivarius</i>	47
Figura 07. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. <i>Lactobacillus reuteri</i>	48
Figura 08. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. <i>Lactobacillus johnsonii</i>	48
Figura 09. Concentração de espécies identificadas de <i>Lactobacillus</i> spp., isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Jejuno.....	49
Figura 10. Concentração de espécies identificadas de <i>Lactobacillus</i> spp., isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Ceco.....	49
Figura 11. Concentração <i>E. coli</i> , isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Jejuno.....	50
Figura 12. Concentração de espécies identificadas de <i>Lactobacillus</i> spp., isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Ceco.....	50

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é um setor que está em franco crescimento e a coturnicultura, por sua vez, segue esta tendência, já que a produção de codornas é uma excelente alternativa para alimentação humana, sendo utilizada tanto para produção de ovos, quanto para produção de carne (Silva et al., 2009). A coturnicultura ainda é uma ótima fonte complementar de renda, pois essas aves demandam pouco espaço para sua criação, baixo custo de investimento e apresenta precocidade produtiva, o que resulta em rápido retorno dos custos de implantação. Segundo Jordão Filho (2008), as codornas são mais resistentes ao calor e a doenças que acometem outras aves, tornando essa atividade altamente promissora para o nordeste brasileiro.

As codornas são originárias da Ásia, Europa e norte da África, pertencem a família dos Fasianídeos (*Fasianidae*) e à sub-família dos *Perdicionidae*, sendo então, da mesma família das galinhas e perdizes (Pinto et al., 2002). Os japoneses, a partir de 1910, iniciaram estudos e cruzamentos entre codornas providas da Europa e espécies selvagens, originando uma ave domesticada chamada de *Coturnix coturnix japonica* ou codorna japonesa. Logo após, esta ave começou a ser explorada, visando à produção de carne e ovos (Reis, 1980) em sistemas de produção com a máxima eficiência produtiva destas.

Em sistemas de criação intensiva, visando manter a produtividade, durante muitos anos foram utilizados antibióticos como promotores de crescimento na ração das aves, por melhorarem o desempenho dos animais. Entretanto, como a utilização de alguns destes medicamentos está atualmente proibida no Brasil e mundo, surgem alternativas, a exemplo do uso de antimicrobianos naturais que atuam como promotores de crescimento e que exercem atividade similar aos promotores de crescimento químicos, devido a sua capacidade de controlar agentes infecciosos, aumentando por consequência, o desempenho animal (Palic et al., 1998; Miles et al., 2006).

Dentre as alternativas, o uso do ácido cítrico destaca-se, por ser um ácido fraco, tricarboxílico, completamente solúvel em água, biodegradável, de baixo ponto de fusão, atóxico, não inflamável, com boa disponibilidade na natureza (Pastore et al., 2011). Além disso, o ácido cítrico reduz o pH intestinal, prevenindo o desenvolvimento e o crescimento de microrganismos patogênicos (Ostermann, Sanfeku e Vieira, 2005; Deepa et al., 2011).

Outro efeito associado ao ácido cítrico é sua possível influência sobre a microbiota no intestino de codornas. Em estudos desenvolvidos por Ogita, Fujita e Tanaka (2009) avaliando o efeito do ácido cítrico em bactérias Gram-negativas, observaram que o ácido

crítico à 20mM possui efeito bacteriostático para *Escherichia coli*, levando a inferir uma possível atuação do ácido cítrico sobre o controle da população de microrganismos oportunistas no organismo das aves.

Aliado a isso, os efeitos deste aditivo na expressão de genes relacionados aos processos oxidativos e transportadores de nutrientes ainda é pouco explorado. Assim, o estudo da nutrigenômica em codornas pode ajudar a compreender melhor a ação metabólica dos nutrientes e seus compostos bioativos sobre a ação gênica, contribuindo efetivamente para se determinar os efeitos e funcionalidade do ácido cítrico no organismo das codornas.

Deste modo, é possível afirmar que pouco se conhece sobre seus efeitos como promotor de crescimento natural quando adicionado às dietas de codornas, em especial em relação a seus efeitos na microbiota intestinal e expressão gênica. Por esta razão, justifica-se estudar e avaliar os efeitos e funcionalidade do ácido cítrico sobre o desempenho, microbiota intestinal e expressão gênica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e Importância das Codornas no Brasil e Mundo

No início do século XIX os japoneses iniciaram trabalhos de cruzamentos entre as codornas oriundas da Europa com espécies silvestres, os cruzamentos resultaram em uma ave doméstica denominada *Coturnix coturnix japônica*, com coloração castanha e comportamento agitado, a qual poderia ser criada de forma racional em pequenos espaços e com produção em escala para atender o mercado, fato este que possibilitou a sua exploração para fins comerciais (Reis, 1980).

De acordo com Barreto et al. (2007), para a coturnicultura industrial existem três tipos disponíveis de codornas: a codorna americana ou Bobwhite quail (*Colinus virginianus*), a japonesa (*Coturnix coturnix japônica*) e a europeia (*Coturnix coturnix coturnix*). Essas aves apresentam características peculiares que direciona cada tipo para suas aptidões: produção de carne (europeia e americana) ou ovos (japonesa).

A avicultura brasileira é de grande importância no cenário mundial e seu expressivo progresso contribui consideravelmente com a criação de empregos diretos e indiretos e na renda, consolidando a economia agropecuária nacional. A coturnicultura é uma divisão da avicultura, onde codornas são criadas para produção de ovos ou para abate. Recentemente essa atividade tem apresentado elevado crescimento, com adequações as novas técnicas e tecnologias de produção, por este fato, no lugar de uma atividade tida como de subsistência passou a ser considerada uma atividade altamente tecnificada e produtiva (Pastore et al., 2012).

A codorna japonesa é a mais difundida mundialmente por sua grande precocidade e alta produtividade (Baungartner, 1994). A prática da criação de codornas no Brasil, foi introduzida no país por volta de 1950, a *Coturnix coturnix japonica* é uma linhagem de baixo peso corporal, com média de 150g por ave quando adulta, utilizada principalmente para a produção de ovos (Pastore et al., 2012). Se comparadas às galinhas poedeiras, que iniciam a postura em torno dos 120 dias de idade, as codornas são mais precoces por iniciarem a postura com menos de 40 dias; além de serem mais tolerantes a temperaturas elevadas e as doenças que normalmente acometem outras aves (Jordão Filho, 2008). Estas características a torna uma ave de fácil difusão e possibilita sua exploração rentável desde agricultura familiar a grandes empresas avícolas.

A difusão desta ave se baseia principalmente no aumento da produção de ovos que está associado a fatores como o rápido crescimento, precocidade produtiva, maturidade

sexual em curto tempo (35 a 42 dias), a alta produtividade (média de 300 ovos/ano), necessidade de pequenos espaços para manter grandes populações de aves, a grande longevidade associada à alta produção (14 a 18 meses), o pequeno investimento e, como consequência, o rápido retorno financeiro (Pastore et al., 2012).

Após a introdução das codornas no Brasil, a atividade continuou crescendo no país. Em 2011, o Brasil passou a ser o quinto maior produtor mundial de carne de codornas e o segundo maior produtor de ovos (IBGE, 2012). Como já mencionado, o crescimento constante do consumo de ovos e da carne de codorna pode estar relacionado a elementos como mudanças sociais e hábitos da população, preço mais acessível, maior conhecimento da qualidade do produto, facilidade de acesso para os consumidores, crescimento acelerado das aves e rápido retorno financeiro com baixos investimentos, favorecendo a comercialização (Silva, 2009; Pastore et al., 2011) e, conseqüentemente, a expansão de sistemas produtivos no Brasil.

A população de codornas no Brasil em 2014, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014) era de 20,34 milhões de cabeças. Um aumento expressivo quando comparado ao ano de 2013, onde houve aumento de 11,9% no número de aves no país. A região sudeste é a maior produtora nacional de codornas, devido à sua proximidade com a região produtora de grãos, tais como milho e soja, ao clima propício à produção dessas aves e por ser uma das maiores regiões consumidoras de produtos destas aves. A produção nessa região corresponde a 78,2% da produção nacional de codornas, sendo São Paulo, o estado com maior população de codornas, correspondendo a 54,5% desta população. Destaque para as cidades de Bastos e Iacri com 19,7% e 14,8% do total, respectivamente (IBGE, 2014).

O rebanho efetivo de codornas no Nordeste em 2014 de acordo com o IBGE era de 1.225.920, representando um aumento de 11,2% quando comparado a 2013. O estado de Sergipe possuía 13.160 codornas em 2012 (0,1% da população total). O Nordeste produziu 18.226.000 de dúzias de ovos em 2013, produção que gerou receita de R\$ 24.249.000,00; sendo Sergipe o menor produtor de ovos, com cerca de 84.000 dúzias de ovos (IBGE, 2013). Em 2014 a produção nacional de ovos de codorna foi de 392,73 milhões de dúzias, representando um aumento de 14,7%, em comparação a 2013 e o valor arrecado foi de R\$ 312.220.000,00 (IBGE, 2014). Estes dados demonstram a importância da coturnicultura para o país e a capacidade do estado em aumentar sua população de codornas e a renda através da ampliação de seus sistemas produtivos.

Contudo, para que a produção seja mantida em níveis desejados é necessária adequação da produção ao mercado consumidor, bem como conhecer as aves a serem criadas; possibilitando aumento de renda, empregos e maior produtividade (Evangelista, Nogueira Filho, Oliveira, 2008).

2.2. Sistema e Processo Digestório

O sistema digestório das aves é composto por: bico (palato superior e inferior), língua, glândulas salivares e botões gustativos, seguido da faringe e do esôfago (dividido em cervical e torácico) que é um tubo muscular que vai desde a faringe até o estômago, possui glândulas mucosas e uma dilatação na região cervical denominada inglúvio (papo) que armazena o alimento ingerido (Bell, 2002). As glândulas desta região produzem muco que possibilita a umidificação do alimento, sendo que existem receptores no inglúvio que controlam a ingestão de alimentos (Palermo-Neto, Spinosa, Górnaiak, 2005).

O estômago é composto por dois compartimentos: o proventrículo (ou estômago glandular) e a moela (ou estômago muscular) separados pelo istmo. A túnica mucosa do proventrículo é altamente pregueada e rica em glândulas do tipo tubulares simples ramificadas formadas por células zimogênicas, secretoras de pepsinogênio, ácido clorídrico (HCl) e muco (Palermo-Neto, Spinosa, Górnaiak, 2005). As secreções glandulares são estimuladas pela presença de alimento no estômago. A proteína ingerida entra em contato com o HCl e é desnaturada para que a pepsina exerça sua função. A mistura do alimento com as secreções é impulsionada do proventrículo para o estômago muscular (moela), o qual é constituído por dois pares de músculos (músculos finos e grossos) que tem a função de triturar e misturar ainda mais o alimento com as secreções gástricas (Bell, 2002; Palermo-Neto, Spinosa, Górnaiak, 2005).

A partir da região pilórica da moela, o quimo formado é carregado para o intestino delgado, sendo este subdividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo. O duodeno consiste em uma alça intestinal que envolve o pâncreas. O pâncreas produz dois tipos de secreções: uma rica em bicarbonato e água que diluem e neutralizam o ácido produzido pelo proventrículo, elevando o pH e tornando o ambiente adequado para as células intestinais, quanto que a outra secreção é rica em enzimas para digestão de proteínas, carboidratos e gorduras. A bile emulsifica e digere gorduras, é produzida pelo fígado, armazenada na vesícula biliar e secretada no intestino (Palermo-Neto, Spinosa, Górnaiak, 2005). Logo após vem o jejuno, que é a porção mais longa do intestinal delgado, possui a marca da ligação com o saco vitelínico denominada de divertículo de Meckel;

posteriormente segue o íleo, sem delimitação definida, com início a partir do divertículo ou oposto aos ápices dos cecos e tendo como fim a ligação cecocólica (Macari, Furlan, Gonzales, 2002).

O Intestino grosso é relativamente curto e sem demarcações definidas, sendo dividido em cecos, cólon, reto e cloaca (Palermo-Neto, Spinosa, Górnaiak, 2005). O ceco está localizado na junção entre o intestino delgado e o intestino grosso, a digestão de proteínas e carboidratos no ceco é pouco relevante; entretanto, através da fermentação microbiana são produzidos ácidos graxos voláteis, os quais são transportados de forma passiva para o sangue (Rutz et al., 2015).

As porções do intestino delgado são divergentes quanto à espessura da túnica muscular e das paredes, pelas diferenças da altura das vilosidades e profundidade de criptas, com função de aumentar a superfície de contato com o alimento, melhorando assim a absorção de nutrientes (Boleli et al., 2008). Os vilos são pregas macroscópicas formados de três tipos de células: caliciformes, os enterócitos e as enteroendócrinas (Maiorka, 2004).

As células caliciformes produzem muco que é formado por glicoproteínas insolúveis em água, as quais têm função de proteção do epitélio do intestino da ação de enzimas digestivas, evitando o poder corrosivo da digesta e dirimir a invasão de patógenos, por se ligarem as glicoproteínas no lugar de se aderirem a mucosa (Boleli et al., 2008). Os enterócitos possuem microvilosidades em seu bordo apical, são continuamente substituídos por enterócitos provenientes das criptas e atuam como barreira física, realizam a absorção, digestão, secreção e defesa. As células enteroendócrinas regulam a digestão e absorção, por secretarem hormônios peptídeos (Boleli et al., 2008).

Para o correto funcionamento celular, os eventos citológicos são primordiais para o desenvolvimento e manutenção da mucosa, sendo eles: perda celular, que é a extrusão que ocorre no ápice da vilosidade, e renovação celular, onde ocorre proliferação e diferenciação de células na cripta e na vilosidade. Através das vilosidades ocorre o transporte dependente de sódio, onde os nutrientes passam do lúmen para o interior das células. São mecanismos constantes necessários para manutenção do tamanho e densidade dos vilos; mantendo, portanto, a capacidade digestiva e absorptiva do intestino (Boleli et al., 2008). A renovação frequente em decorrência de lesões na mucosa demanda considerável gasto energético; devido a esse fator, ocorre declínio na absorção e como consequência decresce o desempenho produtivo, o que enfatiza a importância de um manejo correto e o controle de patógenos intestinais nos sistemas produtivos (Maiorka, 2004).

No intestino delgado, os carboidratos são digeridos através da ação de enzimas digestivas que transformam polissacarídeos e dissacarídeos em monossacarídeos, para serem absorvidos (Macari et al., 2008). A glicose é o principal produto da digestão de carboidratos; sua absorção ocorre através do epitélio intestinal, das uniões intercelulares, por via paracelular, ou por via transcelular, por meio dos enterócitos. Sendo realizada por difusão facilitada ou transporte ativo, que representa cerca de 80% da absorção de glicose, com interação do substrato com proteínas da membrana do enterócito (Wright et al., 2004).

No duodeno ocorre a maior absorção de glicose. A absorção de glicose contra um gradiente de concentração envolve um transporte dependente de sódio, denominado: cotransportador sódio-glicose 1 (SGLT1) que realiza transporte ativo na membrana apical do enterócito, acumula monossacarídeo no interior da célula contra seu gradiente de concentração, através do qual a entrada de açúcares está acoplada ao gradiente eletroquímico de íons de sódio (Wright et al., 2004). Com posterior transporte de glicose na membrana basolateral por difusão facilitada realizada pela proteína transportadora de glicose (*GLUT2*) (Ferraris, 2001). Este mecanismo de absorção é essencial para manutenção do organismo, sendo que os aminoácidos e peptídeos são absorvidos pelos enterócitos através dos sistemas de transportes presentes na borda em escova e na membrana basal do enterócito (Frenhani, Burini, 1999).

Existem outras substâncias que agem no intestino, melhorando o controle das bactérias no local ou melhorando o sistema de defesa no intestino dos animais. Dentre elas, a glutathione faz parte de uma das defesas do organismo contra as espécies reativas de oxigênio (ROS), interfere na catálise, metabolismo e transporte; participa ainda da síntese de proteínas e ácidos nucleicos, da metabolização de peróxidos e da inativação de radicais (Morand et al., 1997). É um dos antioxidantes hidrossolúveis mais importantes, pois o aumento de sua concentração é um indicativo do aumento da proteção antioxidante (Bains, Shaw, 1997). A glutathione peroxidase 7 (*GPX7*) é uma das enzimas que constituem o sistema glutathione e quando ocorre estresse oxidativo há alterações em seu metabolismo (Huber, Almeida, Fátima, 2008). Os sistemas antioxidantes enzimáticos são compostos pelas enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase (Milinkovic-Tur et al., 2007). O sistema antioxidante da glutathione faz parte, junto com a catalase e a *SOD*, dos mecanismos antioxidantes enzimáticos (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Neste contexto, o manejo adequado dos animais, bem como o controle ambiental e sanitário é essencial para que o sistema digestório funcione corretamente, permitindo que o

animal obtenha alta eficiência na conversão de alimentos e menor partição de nutrientes com outros sistemas, tais como o imune; permitindo melhor ganho de peso e maior eficiência no sistema.

2.3. Relação entre Organismo e Microbiota

A microbiota intestinal é o conjunto de microrganismos presentes no trato gastrointestinal, há variações na população entre os segmentos do intestino. Existem microrganismos maléficos e benéficos, sendo que a maioria pertence ao domínio bactéria (Pedroso, 2011). São de extrema importância para produção animal, pois estabelecem relação de cooperação e competição por nutrientes e locais de fixação na mucosa (Ito, Miyaji, Okabayashi, 2007). Além de influenciar a fisiologia, imunologia, bioquímica e a resistência do hospedeiro (Tannock, 1998).

De acordo com Pedroso (2011), bactérias microaerófilas facultativas colonizam o intestino delgado de aves; 70% destas correspondem a *Lactobacillus*, 11% a *Clostridiaceae*, 6,5% a *Streptococcus* e 6,5% a *Enterococcus*. Já em relação às bactérias anaeróbicas obrigatórias, 65% correspondem a *Clostridiaceae*, 14% a *Fusobacterium*, 5% a *Bacteroides* e 8% a bactérias microaerófilas facultativas; ainda há mais 8% de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* que colonizam o ceco.

A microbiota tem diversas funções no organismo, com destaque para o estímulo da produção de mucina, ajudando a inibir a translocação bacteriana (Mattar et al., 2002), modular a expressão de genes ligados a absorção de nutrientes e auxiliar os mecanismos de defesa do sistema imune (Zoco et al., 2007). Também ocupam pontos de ligação na superfície da mucosa intestinal, competição por nutrientes e a liberação de bacteriocinas, realizando exclusão competitiva (Lan et al., 2005). Já a microbiota oportunista, que pode causar efeito patogênico, representa cerca de 10% do total e pode ocasionar infecções entéricas, tendo como causa o desequilíbrio da microbiota intestinal benéfica, facilitando o desenvolvimento de bactérias deletérias, resultando em danos tanto para o sistema digestório, quanto para a ave (Maiorka, 2004).

Dentre elas, destaca-se o gênero *Lactobacillus*, sendo as espécies mais presentes na microbiota das aves o *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus fermentum* no intestino delgado. No duodeno, jejuno e cloaca destacam-se o *Lactobacillus acidophilus* (Andreatti Filho, Sampaio, 1999) e no ceco o *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus acidophilus* (Barros et al., 2009).

O gênero *Lactobacillus* apresenta pH de desenvolvimento ideal entre 4,5 a 6,4, e cessa o seu desenvolvimento em pH entre 3,6 a 4,0 e temperatura de 2°C a 53°C, sendo que a faixa ótima para seu desenvolvimento está entre 30°C a 40°C; produzem lactato, não produzem ácidos graxos voláteis com mais de dois carbonos e podem produzir dióxido de carbono, etanol, formiato e succinato. (Kandler, Weis, 1986).

Segundo Andreatti Filho (2007) os *Lactobacillus* possuem a função de auxiliar o sistema imune por estimular a secreção de IgA intestinal. Também secretam acetato, succinato lactato e etanol, que estimulam a proliferação de outras bactérias como *Bifidiobacterium* sp., *Bacteriodes* sp., *Bacillus* sp., *Veilonella* sp., responsáveis por sintetizarem ácidos graxos voláteis, reduzirem o pH, diminuírem a concentração de oxigênio e se aderirem a parede intestinal limitando a multiplicação de bactérias patogênicas (Ito, Miyaji, Okabayashi, 2007).

Dentre a microbiota oportunista se destacam a *Escherichia coli* e *Salmonella*. A *E.coli* tem seu crescimento ótimo a 37°C, apesar de ser comensal, pode causar enfermidade, principalmente em animais imunossuprimidos (Kariyawasam et al., 2006); já a *Salmonella* apresenta crescimento ótimo em temperatura de 37°C a 40°C (Berchieri Júnior, Freitas Neto, 2009). Possuem predileção pelo trato intestinal, mas podem causar doenças sistêmicas devido a lesões entéricas em animais que possuem desequilíbrio da microbiota intestinal (Porter Junior, 1998).

Assim, pode-se inferir que a formulação de rações com aditivos específicos pode atuar de forma positiva no controle bacteriano ou melhorando a proliferação de bactérias benéficas ao organismo, permitindo obtenção de melhores resultados de desempenho dos animais.

2.4. Uso de Antimicrobianos nas Rações

Os sistemas de criação intensivos de aves possibilitaram aumentos da produtividade, redução do espaço físico para instalações e maior retorno econômico com a atividade (Gopinger, Catalan, Roll, 2013). Contudo, ao mesmo tempo em que é possível obter tais melhorias, implica também em maior risco de contaminações ambientais e, consequentemente, surgimento das doenças dentro do plantel pelo maior número de aves alojadas em espaço reduzido. Portanto, é necessário maior controle sanitário, pois o ambiente se torna mais hostil para as aves aumentando o desafio sanitário no plantel (Arruda, 2013; Gopinger, Catalan, Roll, 2013).

Neste contexto, tornou-se necessário o desenvolvimento e aplicação de técnicas que sejam capazes e eficientes em reduzir a contaminação ambiental e consequentemente, assegurar o desenvolvimento das aves. Por este motivo, o uso de antibióticos como promotores de crescimento tornou-se cada vez mais presentes às dietas a fim de se reduzir a ocorrências de doenças no plantel, assegurando o desempenho em patamares aceitáveis, acompanhando os modelos de produção animal intensivo (Machado, Fontes, 2005).

Dentre os antibióticos utilizados como promotores de crescimento, podemos citar a virginiamicina, linomicina, avilamicina, flavomicina, dentre outros, devido a sua capacidade de controlar agentes infecciosos e aumentar ou pelo menos manter o desempenho animal. No entanto, a utilização destes antibióticos de maneira inadequada, tem levantado questionamentos e discussões entre pesquisadores devido a relação entre antibióticos e resistência bacteriana em humanos (Menten, 2001); principalmente pela utilização de avoparcina, enrofloxacin e tilosina os quais vem sendo contestadas pela possibilidade de desenvolver cepas cada vez mais resistentes contra antibióticos utilizados em humanos (Khachatourians, 1998; Collignon, 2003, Chowdhury et al., 2009).

Outras preocupações levantadas foram quanto às barreiras comerciais que o uso de antibióticos como promotores de crescimento ocasionam referentes à exportação de produtos pecuários, principalmente devido aos possíveis resquícios medicamentosos nos produtos (Palermo Neto, 2006 e 2007).

No Brasil, a virginiamicina, linomicina, avilamicina, flavomicina, dentre outros, têm sido os mais empregados em dietas de frangos de corte, com objetivo de melhorar a taxa de crescimento e a conversão alimentar (Palic, Stankovic, Novakovic, 1998; Miles et al., 2006) por promover a restauração da higidez orgânica, reduzir os efeitos negativos sobre o desempenho e sobre a mortalidade animal, os quais têm relação direta sobre o rendimento e a viabilidade do agronegócio (Spinosa, 2006; Palermo Neto, 2007). É comprovada a melhora no desempenho de aves que consomem antimicrobianos em suas dietas quando comparadas às dietas sem o aditivo (Miles et al., 2006; Toledo et al., 2007).

O crescimento de bactérias patogênicas pode ser limitado, ocasionando aumento da microbiota intestinal autóctone e impedindo o supercrescimento de bactérias patogênicas por meio de competição de nutrientes e pelos locais de fixação (Guedes, França, 2007). Além disso, o metabolismo da microbiota autóctone produz substâncias antibacterianas que associadas ao muco intestinal imobiliza e facilita a eliminação dos patógenos, reduzindo a chance de adesão destes e garantindo a integridade da barreira intestinal; impedindo assim, que patógenos presentes no lúmen penetrem o tecido intestinal e

cheguem a corrente sanguínea (Roth, 2005) influenciando negativamente o desempenho animal.

A preservação da integridade da luz intestinal é regulada pelo tecido linfoide associado ao intestino (GALT), dificultando a adesão das bactérias na mucosa intestinal. O GALT garante que o antígeno permaneça fora do organismo, além disso, tem a função de promover tolerância imunológica a antígenos presentes em alimentos e a outras 400 espécies da microbiota autóctone, melhorando a resposta imunológica pela presença local do antígeno (Spahn, Kucharzik, 2004; Guedes, França, 2007).

De acordo com Stokes e Bailey (2000), o GALT ainda abriga a maioria das células secretoras de imunoglobulinas, sendo em sua maioria IgA. Dessa forma, a imunidade induzida no GALT pode ser transmitida para outras superfícies mucosas (Guedes, França, 2007). Por esse motivo é de fundamental importância o fornecimento de nutrientes que atuem diretamente sobre a proliferação de células secretoras de imunoglobulinas no intestino por assegurar maior proteção ao organismo.

As aves albergam em seu trato gastrointestinal várias bactérias, que variam em número e distribuição de maneira dependente da temperatura e região. Segundo Saif et al. (2008), o *clostridium perfringens* participa normalmente da microbiota intestinal de frangos, mas em situações de desafios, como mudanças bruscas na alimentação, salmoneloses, micotoxinas e coccidiose, estes microrganismos se reproduzem de maneira acelerada e liberam toxinas que causam efeitos nocivos às aves.

O controle de tais microrganismos com uso de métodos alternativos tem se destacado. Dentre eles, os ácidos orgânicos têm sido testados por serem eficientes no controle microbiano do intestino e influenciar de forma benéfica na digestão (Partanen e Mroz, 1999). Estes resultados têm sido observados por restringir a carga de bactérias patogênicas e proporcionar a formação da microbiota benéfica no trato gastrointestinal, já que possuem elevada atividade antimicrobiana. De acordo com Ostermann, Sanfeku e Vieira (2005) os ácidos orgânicos atuam na prevenção e/ou diminuição das infecções causadas por bactérias patogênicas. Contudo, são poucas as pesquisas encontradas com o propósito de avaliar os ácidos orgânicos como promotores de crescimento na dieta de codornas, tanto de corte quanto de postura.

O uso de ácidos orgânicos bem como substâncias análogas tem demonstrado serem eficazes no controle de bactérias patogênicas. Dentre estes, os mais conhecidos são os ácidos fumárico, fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico e o cítrico, pois têm-se constatado que estes ácidos promovem aumento da digestibilidade de nutrientes, melhoram

a morfologia intestinal, promovem a redução da população das bactérias patogênicas e, por sua vez, aumentam a população de bactérias autóctones (Partanen e Mroz, 1999).

O ácido cítrico é um tipo de ácido ainda pouco estudado em relação a sua utilização como promotor de crescimento em rações para animais de produção. Ele se torna potencial como promotor de crescimento, pois assim como outros ácidos orgânicos, ele pode induzir a acidez do meio e apresentar ação antimicrobiana, por reduzir a capacidade de aderência da bactéria à parede intestinal (Eidelsburger, 2001). Entretanto, pouco se conhece sobre seus efeitos quando adicionados à dieta de aves, principalmente em codornas.

2.5.Ácido Cítrico Como Antimicrobiano

O ácido cítrico também conhecido como citrato de hidrogênio é um ácido orgânico fraco, tricarboxílico, completamente solúvel em água, biodegradável, de baixo ponto de fusão, atóxico, não inflamável, presente nos compostos cítricos (Pastore, Salah e Zempuski, 2011). É isolado a partir de frutas cítricas e obtido pelo processo de fermentação de sacarose realizada pelo fungo *Aspergillus niger* ou pela levedura *Candida lipolytica* (Pastore, Salah e Zempuski, 2011). Pode atuar prevenindo a formação e o crescimento de microrganismos e esporos de bactérias patogênicas, consequentemente melhorando o desempenho das aves (Miltenburg, 1999).

Uma das vantagens fundamentais no uso de ácidos orgânicos como promotores de crescimento é que estes são comumente encontrados na natureza e são originados por meio de fermentação microbiana no trato gastrointestinal. Conforme descrito por Osterman, Sanfeku e Vieira (2005) e Deepa, Jeyanthi e Chandrasekaran (2011), esses ácidos são incluídos nas rações de frangos de corte, por conseguirem reduzir o pH intestinal e, consequentemente exercer ação antibacteriana, prevenindo e proporcionando redução de infecções causadas por bactérias patogênicas, a exemplo da *Escherichia coli*. Os níveis encontrados ainda são contraditórios e precisam ser aprimorados, tanto em frangos, quanto em codornas. Gunal et al. (2006), desenvolveram um experimento utilizando a mistura de ácidos orgânicos (propiónico e fórmico) adicionados à dieta de frangos de corte e puderam constatar que os ácidos orgânicos contribuíram para diminuição da população de bactérias gram negativas no intestino das aves.

O uso de ácido cítrico em dietas de frangos tem possibilitado aumentar a densidade de células imunocompetentes no trato gastrointestinal, indicando maior resistência contra patógenos entéricos e doenças infecciosas (Chowdhury et al., 2009; Khatun et al., 2010; Haque et al., 2010); além do possível aumento dos níveis de globulina sérica em dietas de

aves que contém acidificantes (Rahmani, Speer e Modirsanei, 2005; Abdel-Fattah et al., 2008), proporcionando possível aumento na imunidade específica.

Nezhad et al. (2007) estudaram três níveis de inclusão de ácido cítrico (0.0, 2.5, 5.0%) em dietas para frangos e observaram melhoria no desempenho. Haque et al. (2010), observaram que a inclusão de 0,5% do ácido cítrico em dietas de frangos melhorou o desempenho e a qualidade da carcaça dos frangos. Islam (2012) ao avaliar a inclusão de 0,5% de ácido cítrico em dietas de frangos de corte, comprovou que o ácido cítrico pode ser utilizado como promotor de crescimento em frangos de corte com resultados comprovados; no entanto foi verificada grande variação nos níveis de inclusão.

Portanto, é pertinente considerar que o ácido cítrico pode apresentar propriedades similares de outros compostos orgânicos que têm a capacidade de controlar bactérias patogênicas, aumentando assim, o crescimento das aves e trazendo benefícios a produção animal. Estes, aliados à nutrição e ao controle ambiental, provavelmente poderá proporcionar a manutenção da produtividade nos diversos sistemas de criação.

Por isso, são importantes estudos específicos para verificar o efeito do ácido cítrico sobre o desempenho de codornas e definir níveis ideais para garantir o bem estar animal aliado ao máximo desempenho. Além disso, pouco se conhece a respeito de seus efeitos quando adicionados às dietas das aves, principalmente de codornas; circunstância que o torna um aditivo promissor na nutrição animal.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, S. A.; EL-SANHOURY, M. H.; EL-MEDNAY, N. M.; ABDUL-AZEEM, F. Thyroid activity of broiler chicks fed supplemental organic acid. **International Journal of Poultry Science**, v.7, p.215-222, 2008.
- ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. Ed. Rocca Ltda, São Paulo, cap. 6, p. 41-51, 2007.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Revista Educação Continuada CRMVSP**. São Paulo, v.2, p.59-71, 1999.
- ARRUDA, J. N. T. Desempenho produtivo, rendimento de carcaça e bem-estar animal em frangos de corte de diferentes linhagens e densidades de alojamento. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2013.
- BAINS, J. S., SHAW C. A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Research. Reviews**, 25: 335-358, 1997.
- BARRETO, S.L.de T.; QUIRINO, B.J.de S. BRITO, C.O.; UMIGI, R.T.; ARAUJO, M.S de; ROCHA, T.C. da; PEREIRA, C.G. Efeitos de níveis nutricionais de energia sobre o desempenho e a qualidade de ovos de codornas europeias na fase inicial de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.36, n.1, p.86-93, 2007.
- BARROS, M.R., ANDREATTI FILHO, R.L., LIMA, E.T., CROCCI, J.A. Transference in vitro of the resistance to the antimicrobials between *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella* enteritidis isolated from chickens. **Arquivos Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. Botucatu, v.63, n.5, p.1149-1153, 2009.
- BAUNGARTNER, J. Japanese Quail Production Breeding and Genetics. **World's Poultry Science**, v.50, n.3, p. 228-235, 1994.
- BELL, D. D. Anatomy of the Chicken. 5 ed., p.41-58, 2002.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**, 2ª edição, Ed. FACTA, Campinas, 2009.
- BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.75-95, 2008.

CHOWDHURY, R.; ISLAM, K.M. S.; KHAN, M. J.; KARIM, M. R.; HAQUE, M. N.; KHATUN, M.; PESTI, G.M. Effect of citric acid, avilamycin and their combination on the performance, tibia ash and immune status of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 88, p. 1616-1622, 2009.

COLLIGNON, P. A review-the use of antibiotics in food production animals—does this cause problems in human health. **9th Biennial Conference of the Australasian Pig Science Association** (inc.) (APSA), Fremantle, Western Australia, 23-26 November 2003, p. 73-80, 2003.

DEEPA, C.; JEYANTHI, G. P.; CHANDRASEKARAN, D. Effect of Phytase and Citric Acid Supplementation on the Growth Performance, Phosphorus, Calcium and Nitrogen Retention on Broiler Chicks Fed With Low Level of Available Phosphorus. **Asian Journal of Poultry Science** 5, p. 28-34, 2011.

EIDELSBURGER, U. Feeding short-chain organic acids to pigs. Nottingham, **Nottingham University Press**, p. 107-121, 2001.

EVANGELISTA, F. R.; NOGUEIRA FILHO, A.; OLIVEIRA, A. A. P. Avicultura industrial de corte no Nordeste: Aspectos econômicos e organizacionais. **Sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural**, Acre, 2008.

FERRARIS, R. P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. **The Journal of Biochemistry**, v. 360, p. 265-276, 2001.

FRENHANI, P. B., BURINI, R. C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. Controle e implicações na dietoterapia humana. **Arq. Gastroenterol.** V. 36, n. 4, p. 227-235, 1999.

GOPINGER, E.; CATALAN, A.A.S.; ROLL, V.F.B. Efeitos da densidade de alojamento sobre a produção de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**. v.10, n.1, p.2173-2179, 2013.

GUEDES, R. M. C.; FRANÇA, S. A Imunologia do trato digestivo de suínos. In: XIII congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos – ABRAVES, **Anais...** Florianópolis, Sc, 2007.

GUNAL, M.; YAYLI, G.; KAYA, O.; KARAHAN, N.; SULAK, O. The effects of antibiotic grow promoter, probiotic and organic acids supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. **International Journal of Poultry Science** 5 (2), p. 149-155, 2006.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: **Clarendon Press**, p. 543, 1989.

HAQUE, M. N.; ISLAM, K. M. S.; AKBAR, M. A.; KARIM, M. R.; CHOWDHURY, R.; KHATUN, M.; KEMPPAINEN, B. W. Effect of dietary citric acid, flavomycin and their combination on the performance, tibia ash and immune status of broiler. **Canadian Journal of Animal Science** 90, p. 57-63, 2010.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v.40, p.55-59, 2012. –ISSN 0101-4234.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v.42, p. 21-29, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v.41, p.54-58, 2013.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. **Aviagen Brasil**. 2007. Disponível em: <http://www.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/novembro2007-saudeintestinalemfrangosdecorte.pdf> Acesso em: 15 de Junho de 2016.

JORDÃO FILHO, J., Estimativas das exigências de proteína e de energia para manutenção, ganho e produção de ovos em codornas. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** – Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências Agrárias, Areia, 2008.

KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; DEBROY, C.; NOLAN, L. K. Occurrence of pathogenicity island LAPEC-O1 genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. **Avian Diseases**. Kennet Square, v.50, p.405-410, 2006.

KHACHATOURIANS, G. G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic resistant bacteria. **Canadian Medical Association Journal** 159, p. 1129-1136, 1998.

KHATUN, M.; ISLAM, K.M. S.; HOWLEDER, M.A. R.; HAQUE, M. N.; CHOWDHURY, R.; KARIM, M. R. Effects of dietary citric acid, probiotic and their combination on the performance, tibia ash and non-specific immune status of broiler. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 80, p. 813-816, 2010.

KLANDER, O., WEISS, N. Regular, nonsporulating Gram-positive rods. In: HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1208-1234.

LAN, Y., VERSTEGEN, M.W.A., TAMMINGA, S., WILLIAMS, B.A. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**. Cambridge, vol. 61, n. 01, p. 95-104, 2005.

MACARI, M., FURLAN, R. L., GONZALES, E. **Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte**, 2 edição, p.209-230,2008.

MACARI, M., FURLAN, R.L., GONZÁLES, E. 2002. Ingestão de alimentos: Mecanismos regulatórios. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Ed. Funep/UNESP. Jaboticabal, SP. 2: 187-192.

MACHADO, G. S.; FONTES, D. O. Relação entre as exigências nutricionais e o sistema imune em suínos. In: II simpósio internacional sobre exigências nutricionais de aves e suínos. **Anais...** Viçosa, Minas Gerais, 2005.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. **Anais...** Chapecó, p. 26-41, 2004.

MATTAR, A. F., D. H. TEITELBAUM, R. A. DRONGOWSKI, F. YONGI, C. M. HARMON, AND A. G. CORAN. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a caco-2 cell-culture model. **Pediatric Surgery International**. Ann Arbor, v. 18, n. 7, p. 586-590, 2002.

MENTEN, J. F. M. Aditivos Alternativos na Produção de Aves: Probióticos e Prebióticos. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38, Sociedade Brasileira de Zootecnia, **Anais**, Piracicaba, p.141-157, 2001.

MILES, R. D.; BUTCHER, G. D.; HENRY, P. R.; LITTELL, R. C. Effect of Antibiotic Growth promoters on Broiler Performance Intestinal Growth Parameters, and Quantitative Morphology. **Poultry Science** 85, p.476-485, 2006.

MILINKOVIC-TUR, S.; STOJEVIC, Z.; PIRSLJIN, J.; ZDELAR-TUK, M.; POLJICAK-MILAS, N.; LJUBIC, B. B.; GRADINSKI-VRBANAC, B. Effect of fasting and refeeding on the antioxidant system in cockerels and pullets. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 55, n. 2, p. 181-189, 2007.

MILTENBURG, G. Tendencia futura del uso de aditivos en nutrición aviar. **Revista Avicultura Profesional**, v.17, p.33-35, 1999.

MORAND, C., RIOS, L., MOUNDRAS, C., BESSON, C., REMESY, C., DEMIGNE, C. 1997. Influence of methionine availability on glutathione synthesis and delivery by the liver. **J Nutr. Biochem**. 8:246-25.

OGITA, A., FUJITA, K. I., TANAKA, T. Salinomycin and citric acid in combination demonstrate bactericidal activity against Gram-negative bacteria. **Ann. Microbiol.** p.59, 2009.

OSTERMANN, D.; SANFEKUCE, A. M.; VIEIRA, S. L. Metabolismo E Bases Conceituais Para a Ação Benéfica de Ácidos Orgânicos para Frangos de Corte. In: **Ave World: A Revista do Agricultor Moderno**. São Paulo, ano 3, n. 15, p. 28-31, 2005.

PALERMO NETO, J. Considerações gerais sobre o uso de agentes que alteram a produção animal. In: Spinosa, H, Górnaiak, SI & Bernardi, Mm (Eds) **Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio De Janeiro, (4ª Ed), p. 587-595, 2006.

PALERMO NETO, J. O problema do uso inadequado de antibióticos na produção de suínos. **Acta Sci. Vet.** 35, p. 199-208, 2007.

PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GORNIAK, S. L. **Farmacologia aplicada a avicultura**. São Paulo: Roca, p.11-35, 2005.

PALIC, T.; STANKOVIC, Z.; NOVAKOVIC, Z. Effects of Simultaneous Application of Sacox and Flavomycin Preparations on Broiler Performance and Health. **Zivinarstvo** 33, p.211-214, 1998.

PARTANEN, K.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v.12, p. 117-145.1999.

PASTORE, N. S.; SALAH, M. H.; ZEMPUSLKI, D. A. Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus Niger*: Avaliação de Diferentes Fontes de Nitrogênio e de Concentração de Sacarose, **Engevista**, v. 13, n. 3, p.149-159, 2011.

PASTORE, S. M.; OLIVEIRA, W. P.; MUNIZ, J. C. L. Panorama da Coturnicultura no Brasil. **Revista Eletrônica Nutrime**. V. 9, n. 06, nov/dez. 2012. Disponível em: <<http://www.nutrime.com.br>> Acesso em: 23 de Setembro. 2014. - ISSN 1983-9006

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

PINTO, R.; FERREIRA, A. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; VARGAS, J. G. J. Níveis De Proteína e Energia para Codornas Japonesas em Postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p.1761-1770, 2002.

PORTER JUNIOR, R. E. Bacterial enteritides of poultry. **Poultry Science**. West Lafayette, v.77, n. 8, p. 1159–1165, 1998.

RAHMANI, H. R., SPEER, W.; MODIRSANEI, M. The effect of intestinal pH on broiler performance and immunity. Proceedings of the 15th European Symposium on poultry

nutrition, Balatonfured, **Netherlands: World's Poultry Science Association (WPSA)**, Hungary (25-29 September), p. 338-340, 2005.

REIS, L. F. S. D. Codornizes, Criação e Exploração. Lisboa: **Agros**, 10, p.222, 1980.

ROTH, J. A. The porcine innate immune system. *Anais: Am. Assoc. Swine Vet*, p. 467-471, 2005.

RUTZ, F., FERNANDO, V. B., XAVIER, E. G., ANCIUTI, M. A., LOPES, D. C. N. Fisiologia da digestão e da absorção em aves. In: **XVI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e VII Brasil Sul Poultry Fair**. Chapecó-SC, p.58-71, 2015.

SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Oxford: Blackwell publishin, p. 1409, 2008.

SILVA, J.H.V. **Tabelas para Codornas Japonesas e Européias**. Jaboticabal-SP, 2º edição, p. 107, 2009.

SILVA, R. M.; FURLAN, A. C.; TON, A. P. S.; MARTINS, E. N.; SCHERER, C.; MURAKAMI, A. E. Exigências Nutricionais de Cálcio e Fósforo de Codornas de Corte em Crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.1509-1517, 2009.

SPAHN, T. W.; KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: The role of SPINOSA, H. Considerações gerais sobre o uso de antimicrobianos. In: Spinosa, H, Górnaiak, SI & Bernardi, Mm (Eds) *Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária*. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, (4ª Ed), p.433-439, 2006.

STOKES, C. R.; BAILEY, M. The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunization? **J. Biotech.** 83,p. 51-55, 2000.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 527-533, 1998.

TOLEDO, G. S. P.; COSTA, P. J. C.; SILVA, D. P.; FERREIRA, P.; POLETO, C. J. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural**, Santa Maria, V. 37, n. 6, p. 1760-1764, dez 2007.

WRIGHT, E. M.; LOO, D. D.; HIRAYMA, B. A.; TURK, E. Surprising versatility of NA⁺ Glucose co-transporte: SCL5. **Physiology**, v19, p. 370-376, 2004.

ZOCCO, M. A., AINORA, M. E., GASBARRINI, G., GASBARRINI, A. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects. **Digestive and Liver Disease**. Roma, v. 39, n. 8, p. 707-712, 2007.

NEZHAD, Y. E.; SHIVAZAD, M.; NAZEERADL, M.; BABAK, M. M. S. Influence of citric acid and microbial phytase on performance and phytate utilization in broiler chicks

fed a corn, soybean meal diet. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine**, v. 61, p. 407-413, 2007.

ISLAM, K. M. S. Use of citric acid in broiler diets. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, p. 104-118, 2012.

CAPÍTULO I

ÁCIDO CÍTRICO COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO PARA CODORNAS

RESUMO

NUNES, Adriano Silva. **Ácido cítrico como promotor de crescimento para codornas**. Sergipe: UFS, 2016. 57p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia)

RESUMO: Foram avaliados os efeitos de diferentes níveis de ácido cítrico como promotor de crescimento em dietas de codornas japonesas. Para isso, realizou-se um ensaio *in vitro* e um teste a campo a fim de verificar tais efeitos sobre microrganismos patogênicos e desempenho. O ensaio *in vitro* foi realizado no Laboratório de Bacteriologia da UFS utilizando três níveis de ácido cítrico (0,0, 0,6 e 1,2%) a fim de verificar sua influência sobre *Escherichia coli* e *Salmonella*. O ensaio de desempenho foi realizado no Campus Rural da UFS em São Cristóvão-SE. As aves (450 codornas) foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, dentro de cinco tratamentos, nove repetições e 10 aves por unidade experimental. As rações continham cinco níveis de ácido cítrico: 0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2% formuladas para serem isoprotéicas e isoenergéticas. Água e ração foram ofertadas à vontade. O experimento teve duração de 35 dias. As codornas foram pesadas no início e no fim do experimento, sendo que ao final foram abatidas para coleta de material para avaliar o peso relativo de órgãos, a resistência óssea, e para as análises microbiológicas e de expressão gênica. O ácido cítrico influenciou o ganho de peso ($P=0,01$), a conversão alimentar ($P=0,05$) e a expressão dos genes *B⁰AT1*, *SGLT1*, *GPX 7* e *SOD* a 1% de probabilidade. O ácido cítrico não inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* no ensaio *in vitro*. O ácido cítrico melhorou a expressão do transportador de aminoácidos e cotransportador sódio-glicose 1. Os níveis de ácido cítrico testados não controlaram o crescimento de *Streptococcus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* no organismo das codornas durante o experimento e o melhor nível de ácido cítrico em dietas para codornas de postura foi de 0,60%.

Palavras chave: Antimicrobiano; aves; expressão gênica; microbiologia; produção animal

ABSTRACT

NUNES, Adriano Silva. **Citric acid as a growth promoter for quail**. Sergipe: UFS, 2016. 57p. (Dissertation - Master Degree in Animal Science)

ABSTRACT: The impacts of diverse levels of citric acid as a growth agent in the diet of Japanese quails was evaluated. To this end, an in vitro and a field test were realized as to verify such impacts on pathogenic microorganisms and performance. The in vitro testing was done in the UFS Bacteriology Lab, utilizing three levels of citric acid (0,0%; 0,6% and 1,2%) to verify its impact on *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. The performance test was realized on the UFS Rural Campus, on the municipality of São Cristóvão-SE. The birds (450 quails) were divided in total random design with five treatments, nine iterations and 10 birds per unit. The portions were formed with five levels of citric acid: 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; and 1,2%, intended to keep the diets isoenergetic and isoproteinic, being served at will as same as the water. The trials spanned 35 days. The quails were weighed at the beginning and the end of the testings, being put down at the end to evaluate the relative weight of organs, bone strength, microbiological and gene manifestation analysis. The citric acid had an impact on growth ($P=0,01$), feed conversion ($P=0,05$), as well as manifestation of the genes *B⁰AT1*, *SGLT1*, *GPX 7*, and *SOD* to 1% of probability. The citric acid did not inhibit *Escherichia coli* and *Salmonella* spp growth in the in vitro tests. The citric acid improved the manifestation of aminoacids transporter and Sodium-glucose cotransporter 1. The citric acid levels did not control the *Streptococcus*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in the Quails' organisms during the experiment and best citric acid level for growing laying quails diet is of 0,60%.

Keywords: Antimicrobial; birds; gene expression; microbiology; animal production

1. INTRODUÇÃO

A agropecuária é um setor de grande importância para a economia brasileira e a avicultura é uma atividade que se destaca, a coturnicultura por sua vez segue essa mesma tendência. Visando atender ao mercado consumidor, os coturnicultores precisam se adequar as exigências do mercado. Atualmente destaca-se a proibição quanto ao uso de antibióticos melhoradores de desempenho em rações de animais destinados ao consumo humano. Esta proibição vem de questionamentos a respeito da possível resistência bacteriana em humanos, tornando-se uma tendência mundial. Entretanto, pesquisas vêm sendo realizadas com potenciais aditivos alternativos melhoradores de desempenho, com destaque para os ácidos orgânicos.

O uso de aditivos melhoradores de desempenho é essencial para manter a produtividade nos sistemas de criação, pois são capazes de controlar o crescimento de microrganismos oportunistas, facilitando a digestão e absorção de nutrientes, fazendo com que os animais expressem todo o seu potencial produtivo.

Os resultados encontrados na literatura indicam que diferentes efeitos são obtidos com o uso dos ácidos orgânicos como melhoradores de desempenho, esses efeitos são dependentes do tipo de ácido, nível de inclusão e grau do desafio. Devido à aptidão que o ácido cítrico apresenta e a escassez de estudos sobre o aditivo, fez com que o promotor de crescimento se destacasse em dietas para codornas, segundo Ogita, Fujita e Tanaka (2009) devido ao efeito bacteriostático para *Escherichia coli*. Entretanto, são necessários maiores estudos a respeito do ácido cítrico como promotor de crescimento em dietas de codornas.

Aliado a este, o uso da nutrigenômica avalia a expressão de genes relacionados aos processos oxidativos e transportadores de nutrientes. Fatos que justificam o estudo dos efeitos e funcionalidade da suplementação de ácido cítrico como promotor de crescimento em dietas de codornas de postura alojadas no nordeste brasileiro, sobre desempenho, microbiota intestinal e expressão gênica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento *in vitro* e um ensaio de desempenho foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes níveis de ácido cítrico na dieta de codornas japonesas. O ensaio *in vitro* foi conduzido com três níveis de ácido cítrico para avaliar se o ácido exerce ou não influência sobre a população de *Escherichia coli sp.* e *Salmonella sp.* No ensaio de desempenho avaliou-se o desempenho, desenvolvimento dos órgãos, resistência óssea e a expressão gênica no duodeno de codornas que consumiram o ácido.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Produção (CEPAP) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob o número 09/2015.

Experimento 1. Teste de Sensibilidade

Foi realizado o teste de sensibilidade (Antibiograma) com o objetivo de determinar a capacidade do ácido cítrico em inibir e/ou cessar o crescimento de microrganismos patogênicos pelo método *in vitro*. Os efeitos do ácido cítrico sobre os microrganismos patogênicos foram testados no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) utilizando o protocolo padrão de acordo com os quesitos da Norma M2-A8, Vol. 23 N° 1 da ANVISA, com adaptações. As adaptações foram à substituição dos discos antimicrobianos por poços realizados na placa de Petri.

Para realizar o teste antimicrobiano, *Salmonella spp* e *Escherichia coli* foram diluídas, utilizando a escala de MacFarland como referência, obtendo a concentração de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL e semeadas nas placas de Petri. Posteriormente, após o seu crescimento, foram perfurados poços de 6,0mm de diâmetro nas placas de Petri com o auxílio de ponteiras de pipetas estéreis e em seguida, 20µl do ácido cítrico diluído em solução salina com pH de 6,0 foram aplicados em cada poço.

Três concentrações de ácido cítrico (0,0; 0,6 e 1,2%) foram testadas em duplicata e o poder de inibição do ácido foi avaliado utilizando paquímetro para mensurar o halo de inibição.

Experimento 2. Uso do Ácido Cítrico Como Promotor de Crescimento Para Codornas de Postura

2.1. Local

O experimento de campo foi conduzido de 26 de janeiro a 01 de março de 2016 no Setor de Coturnicultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias Aplicadas da Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão, Brasil. O setor está localizado a 10° 55'27.9" Sul e 37° 12'00.6" Oeste.

2.2. Delineamento e Tratamentos Experimentais

Foram utilizadas 450 codornas (*Coturnix coturnix japonica*) fêmeas com nove dias de idade com peso médio de $22,7g \pm 0,9g$. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, dentro de cinco tratamentos, nove repetições e dez aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de cinco níveis crescentes de ácido cítrico adicionado às dietas das codornas, considerando-se: Tratamento 1 – Ração referência, sem ácido cítrico; Tratamento 2 – Ração referência + 0,3% de ácido cítrico; Tratamento 3 – Ração referência + 0,6% de ácido cítrico; Tratamento 4 – Ração referência + 0,9% de ácido cítrico e Tratamento 5 – Ração referência + 1,2% de ácido cítrico, conforme apresentado na **Tabela 1**.

As rações foram formuladas para atender às exigências nutricionais das codornas japonesas segundo recomendações contidas em Rostagno et al. (2011). Foi adicionado inerte às rações experimentais para garantir a variação na inclusão do ácido cítrico. Durante todo o período experimental a água e à ração foram oferecidas à vontade atendendo aos princípios de ética e bem-estar animal. O experimento teve duração de 35 dias.

2.3. Procedimentos Experimentais

As aves foram alojadas do nono ao 44º dia de vida em galpão de alvenaria com dimensões de 6,0 metros de comprimento, 4,0 metros de largura, laterais teladas, pé direito de 2,8 metros, piso de concreto, coberto com telhas de amianto e fachadas norte e sul fechadas por parede até o teto.

As aves foram alojadas em gaiolas de arame galvanizado medindo 50 cm de largura, 50 cm de comprimento e 40 cm de altura, dispostas em bancadas horizontais e equipadas com comedouros tipo calha e bebedouros tipo pendulares de pressão. O piso das gaiolas foi

forrado com cama de maravalha reutilizada proveniente de uma coturnicultura de corte localizada no município de Barra dos Coqueiros, em Sergipe, a fim de ocasionar maior desafio sanitário às aves e simular um ambiente de criação comercial.

Tabela 1 - Composição calculada das dietas experimentais

Ingredientes	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,00	0,30	0,60	0,90	1,20
Milho	49,974	49,974	49,974	49,974	49,974
Farelo de soja	39,830	39,830	39,830	39,830	39,830
Sal Comum	0,398	0,398	0,398	0,398	0,398
Núcleo inicial ¹	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Ácido Cítrico	0,000	0,300	0,600	0,900	1,200
Óleo de soja	3,520	3,520	3,520	3,520	3,520
L-Lisina HCl	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
DL-Metionina	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046
L-Treonina	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
Inerte	1,200	0,900	0,600	0,300	0,000
Total	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
Composição das dietas experimentais					
EM (kcal/kg)	2900	2900	2900	2900	2900
Proteína bruta (%)	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00
Lisina dig. (%)	1,120	1,120	1,120	1,120	1,120
Met.+Cist. dig. (%)	0,760	0,760	0,760	0,760	0,760
Treonina dig. (%)	0,790	0,790	0,790	0,790	0,790
Triptofano dig. (%)	0,256	0,256	0,256	0,256	0,256
Valina dig. (%)	0,950	0,950	0,950	0,950	0,950
P disponível (%)	0,443	0,443	0,443	0,443	0,443
Cálcio (%)	0,961	0,961	0,961	0,961	0,961
Sódio (%)	0,176	0,176	0,176	0,176	0,176
Cloro (%)	0,287	0,287	0,287	0,287	0,287

¹ Núcleo Inicial (por Kg do produto): Ác. Fólico – 24,00 mg; Ác. Pantotênico – 300,00 mg; Bacitracina de Zinco – 440,00 mg; Biotina – 4,00 mg; Cálcio – 170,00 g; Cobre – 180,00 mg; Colina – 7138,00 mg; Ferro – 900,00 mg; Fosforo – 65,00 g; B.H.T. – 150,00 mg; Iodo – 18,00 mg; Manganês – 2000,00 mg; Metionina – 24 g; Niacina – 960,00 mg; Salinomicina – 1200,00 mg; Selênio – 7,50 mg; Sódio – 34,00 g; Vit. A – 188700,00 UI; Vit. B1 – 50,00 mg; Vit. B12 – 275,00 mcg; Vit. B2 – 150,00mg; Vit. B6 – 62,00 mg; Vit. D3 – 57600,00 UI; Vit. E – 312,00 UI; Vit. K3 – 44,00 mg; Zinco 400,00 mg.

A temperatura máxima e mínima no interior dos galpões foi mensurada utilizando termo-higrômetro digital (Indor Outdoor Thermometer With Hygrometer Model- TA318) e registrados diariamente às 08:00 horas; enquanto que a umidade relativa do ar foi mensurada através de Datalogger (RS-232), sendo os dados coletados diariamente às 08:00, 12:00 e 17:00 horas. Os equipamentos foram alocados à altura dos animais e dispostos no centro da sala.

As codornas foram pesadas no início e no encerramento do experimento, ou seja, no 9º e 44º dia de vida dos animais. As rações foram pesadas sempre que fornecidas e as sobras coletadas e pesadas ao final de cada semana. O desempenho das aves foi avaliado através do ganho de peso das aves, consumo de ração e conversão alimentar durante o período experimental.

Ao final do experimento, quatro aves com o peso médio da parcela, sem jejum alimentar, foram abatidas por deslocamento cervical conforme descrito na Instrução Normativa Número 3 de janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para que fosse possível a coleta de amostras do conteúdo intestinal e dos segmentos do duodeno e jejuno, os quais foram reservados para análises microbiológicas.

As vísceras (fígado, proventrículo, moela, pâncreas e o intestino delgado) foram retiradas, limpas e pesadas para mensurar o peso absoluto e relativo dos órgãos. O peso relativo dos órgãos foi calculado de acordo com a equação: $\text{Peso relativo do órgão (\%)} = [(\text{peso do órgão, kg} / \text{peso vivo, kg}) * 100]$. Também foi avaliado o comprimento do intestino para verificar possíveis efeitos do aditivo sobre o intestino e processo de digestão dos animais.

Após a coleta dos cecos da carcaça, imediatamente após o abate, o conteúdo do órgão de uma codorna por unidade experimental foi retirado por meio de pressão e o pH mensurado segundo a metodologia empregada por Coon et al. (1990).

As tíbias esquerdas de duas aves por unidade experimental foram previamente coletadas e congeladas, para posterior análise de resistência óssea. Após o descongelamento, tiveram retirado todo o tecido muscular, ligamentos e articulações com auxílio de bisturi e tesouras; seguiu-se para a secagem e então, enviadas para análises.

Os testes de resistência óssea foram realizados em máquina de ensaio de tração Instron 3367, com célula de carga de 5 KN, apoiadas em bases com 28mm de distância entre elas. As amostras foram medidas para determinação do meio exato para receber a pressão de 0,5 mm/min.

2.4. Análises Microbiológicas

Para as análises microbiológicas foram coletados por meio de pressão, os conteúdos intestinais do jejuno e ceco de uma ave por unidade experimental, sendo armazenados em eppendorfs estéreis, congelados e enviados para a Universidade Federal de Minas Gerais para serem analisados. Para *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Foi utilizado o kit API® da bioMérieux.

Para *Lactobacillus* spp. o material coletado foi pesado e recuperado em um tubo contendo solução salina tamponada (5,61 g de NaCl, 1 g de KH₂PO₄, 2 g de Na₂PO₄ e 0,11 g de KCl em 1.000 mL de água destilada). Esses tubos foram introduzidos, no menor intervalo de tempo a seguir, dentro de uma câmara anaeróbica (Forma Scientific Company, Marietta, USA), contendo uma atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂. Dentro da câmara anaeróbia, os materiais colhidos foram suspensos e homogeneizados, com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, diluições decimais até 10⁻⁷ foram preparadas com salina tamponada. A partir de diluições adequadas (10⁻⁵ e 10⁻⁷) foi usada uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição para semear uma placa de Petri contendo ágar MRS, de Man - Rogosa - Sharpe (Difco, Darmstadt, Alemanha). Após espalhar o inóculo com alça de Drigalski, as placas foram incubadas a 37°C, na câmara anaeróbica, durante 48 horas, quando foram feitas as contagens (UFC/g do conteúdo intestinal) e o isolamento.

Numa placa contendo em torno de 100 unidades formadoras de colônia (UFC), as colônias morfológicamente diferentes e mais significativas do ponto de vista populacional foram repicadas, a partir do ágar MRS (Difco), no mesmo meio. A partir de colônias, de cada amostra, que apresentarem aspectos morfológicos distintos foram feitos esfregaços em lâminas para coloração pelo método de Gram. Além disto, a partir dessas mesmas colônias foram feitos testes de catalase em lâmina, utilizando-se H₂O₂ (30%). Aqueles que se apresentaram como Gram-positivo e catalase negativa, sugestivos de pertencerem ao gênero *Lactobacillus*, foram submetidos à identificação, utilizando técnicas de biologia molecular.

Após, foi realizado o teste respiratório, onde as amostras foram repicadas, em triplicata, para placas de Petri contendo ágar MRS (Difco). As placas foram incubadas sob três condições de cultivo diferentes: aerobiose, microaerofilia e anaerobiose. O material foi incubado durante 48 horas a 37°C. Para a purificação e manutenção os microrganismos foram isolados e avaliados pelas características morfo-tintoriais, bioquímicas e fisiológicas e pelo teste respiratório foram inoculados em 5 mL de caldo MRS (Difco), sendo em seguida incubados em anaerobiose, à 37°C durante 48 horas. Após o crescimento, uma

alíquota de 500 mL de cada tubo foi transferida para tubo eppendorf e adicionada de glicerol esterilizado (50 mL), sendo, em seguida, congelados a - 18°C e -86°C, para posterior utilização, quando necessário. O restante dos cultivos foi destinado às análises baseadas em técnicas de biologia molecular, com a finalidade de identificação das espécies isoladas.

Para a ativação, as amostras de *Lactobacillus* spp. pré-identificadas pelo perfil de fermentação de carboidratos (kit API 50 CHL, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), foram descongeladas e inoculadas (200 mL) em caldo MRS (Difco). O meio foi incubado, sob condições de anaerobiose, a 37°C, durante 48 horas. Após cinco passagens em caldo, 50mL de cada amostra foram repicados em ágar MRS (Difco), por três métodos diferentes: pour-plate, espalhamento com auxílio da alça de Drigalski e estria. Então, as placas foram incubadas em anaerobiose, sendo mantidas a 37°C, durante 48 horas.

A identificação de microrganismos produtores de ácido láctico, pela Técnica de Biologia Molecular - PCR-ARDRA, foi realizada no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

A extração do DNA total dos microrganismos isolados de ágar MRS (Difco) foi realizada a partir do cultivo recente em caldo MRS (Difco), incubado sob anaerobiose, a 37°C, durante 24 horas, como descrito anteriormente.

De cada cultivo dos microrganismos que crescerem em caldo MRS, 10 mL foram centrifugados a 1.500 g, durante 30 minutos, à temperatura de 4°C, para obtenção dos pellets. Os sobrenadantes foram descartados. Os pellets foram lavados com 10 mL de água deionizada e centrifugados a 1.500 g, durante 10 minutos. Os pellets foram suspensos em 1 mL de cloreto de lítio (5 M), transferidos para tubos eppendorf e incubados, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por uma hora, com a finalidade de extrair proteínas associadas à parede bacteriana. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 15.350 g, durante 5 minutos, descartando-se os sobrenadantes. Os pellets foram novamente suspensos e lavados com 1 mL de água deionizada, para retirar o excesso de sal. Os tubos foram centrifugados a 15.350 g, durante 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Os pellets foram suspensos em 1 mL de tampão (25 mM de sacarose, 50mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 10 mg de lisozima mL⁻¹ e 100 mg de RnaseA mL⁻¹) para obtenção dos protoplastos. O material foi incubado por uma hora, sob agitação a 37°C. Os tubos foram centrifugados a 15.350 g, durante 5 minutos e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, os pellets foram suspensos em 500 mL de tampão descrito acima (sem sacarose e

lisozima) e as células foram lisadas com a adição de 100mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%.

Em cada tubo, foram acrescentados 600 mL de fenol, sendo agitados à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida, os mesmos foram centrifugados a 15.350 g, a 20°C, durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 600 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), sendo agitados à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida, os mesmos foram centrifugados a 15.350 g, a 20°C, durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 600 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo agitados à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida, os mesmos foram centrifugados a 15.350 g, a 20°C, durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 600 mL de isopropanol, sendo centrifugados a 15.350 g, durante 30 minutos, para precipitação do DNA. Os sobrenadantes foram retirados e os pellets foram lavados com 500 mL de etanol (70%), sendo centrifugados a 15.350 g, durante 10 minutos, a 20°C. O álcool foi retirado e o pellet foi suspenso em 100 mL de TE sem RNase.

Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA total extraído na etapa anterior, as amostras de DNA extraído foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Cinco mL de cada amostra de DNA total extraído foram misturados com 1 mL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol). Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de 3 mL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 40 minutos. Paralelamente, no mesmo gel, foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 Kb. Ao término da corrida, os géis foram fotografados, por meio de equipamento de fotodocumentação, sob incidência de luz ultravioleta.

Posteriormente, as amostras de DNA total foram submetidas à reação de PCR (**Tabela 2**), visando amplificar a região intergênica espaçadora entre as subunidades ribossomais (16S e 23S) de *Lactobacillus*, de acordo com metodologia proposta por Tilsala e Alatossava (1997), utilizando iniciadores universais que se anelam nas regiões conservadas dos genes 16S e 23S rRNA. Esta região do DNA é bastante variável entre as espécies de microrganismos, porém, bastante conservada em microrganismos da mesma espécie, sendo então, utilizada em pesquisas de identificação microbiana, ao nível molecular (Barry et al., 1991).

Tabela 2 - Reação de PCR-ARDRA16S-23S rRNA

DNA total diluído	5,0 mL
Tampão da enzima Taq DNA polimerase (10 x)	5,5 mL
Deoxinucleotídeos (2 mM)	5,5 mL
Iniciador senso (16S)*	5,5 mL
Iniciador reverso (23S)**	5,5 mL
Taq DNA polimerase (5 U)***	2,0 mL
Água deionizada	26,0 mL

*Primer 16-1a. 5' – GATCGCTAGTAATCG – 3'

**Primer 23-1b. 5' – GGGTTCCCCATTCGGA – 3'

***Phoneutria Biotecnologia & Serviços, Brasil

Em seguida, os tubos eppendorf, contendo as amostras de DNA com os reagentes, foram colocados dentro da máquina termocicladora MJ Research (Watertown, Massachussets, United States) (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Programação Termocicladora MJ Research

Desnaturação	95° C	2 minutos e 30 segundos
Desnaturação	94° C	30 segundos
Anelamento dos iniciadores	55° C	1 minuto
Extensão	72° C	1 minuto
Extensão final	72° C	10 minutos
Conservação	4° C	Tempo indefinido

Posteriormente, 5 mL de cada produto de PCR foram misturados com 1 mL do tampão glicerol com azul de bromofenol, e então, submetidos à nova eletroforese em gel de agarose (1,4 %), adicionado de 3 mL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 45 minutos. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas.

Após a obtenção dos produtos de PCR, os mesmos foram submetidos à ação de endonucleases (ARDRA), de acordo com compilação de sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank, para a identificação das espécies de bactérias isoladas. As enzimas utilizadas foram: Sph I, Nco I, Nhe I (que cortam o DNA dentro do gene 16S), Ssp I, Sfu I, Dra I, Vsp I, Eco RI (que clivam o DNA na região espaçadora), Hinc II ou Hpa I e Hind III (que clivam o DNA dentro do gene 23S). Também foi utilizada a

enzima Eco RV, que cliva o DNA de *Lactobacillus* do grupo casei na região intergênica 16S-23S e dentro do gene 23S no grupo acidófilo. Todas as enzimas utilizadas foram adquiridas da companhia Promega Corporation (Madison, Wisconsin, United States). Como algumas destas enzimas necessitam de albumina sérica bovina (BSA) para sua melhor atividade, foram preparadas duas misturas. A primeira mistura denominada de MIX 1 continha, com BSA foi composta por: 3,75mL de DNA (Produto de PCR), 1,0mL de tampão 10 x, 1,0mL de BSA 10 x, 4,0mL de água deionizada e 0,25mL de enzima. A segunda mistura denominada de MIX 2, sem BSA, foi composta por: 3,75mL de DNA (Produto de PCR), 1,0mL de tampão 10 x, 5,0mL de água deionizada e 0,25mL de enzima.

Após o preparo dos tubos, os mesmos foram mantidos à 37°C, durante uma a seis horas, para proceder à reação enzimática. Em seguida, 5 mL de cada produto foram misturados com 1 mL do tampão glicérol com azul de bromofenol, e então, submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%), adicionado de 3 mL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 45 minutos. Os resultados foram visualizados por transluminador com luz ultravioleta e foram fotografados. O perfil de restrição enzimática de cada produto de PCR-ARDRA 16S-23S foi comparado com o perfil de restrição característico de cada espécie de bactéria produtora de ácido láctico, sendo assim confirmada a identificação específica.

2.5. Expressão Gênica

Paralelo ao experimento de desempenho, 30 codornas foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado dentro de três tratamentos, considerando a codorna como unidade experimental. As análises de expressão gênica foram realizadas no duodeno das codornas que consumiram níveis crescentes de ácido cítrico: 0,0; 0,6 e 1,2% na dieta do nono ao 35º dia de vida. As composições das rações experimentais estão apresentadas na **Tabela 1**.

Ao completar 35 dias, as codornas foram abatidas por deslocamento cervical de acordo com as instruções do MAPA (2000) para coleta das amostras do duodeno (n=5, por tratamento). Essas amostras foram imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido, e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1,0 mL para cada 100 mg de tecido. Previamente todo o material utilizado foi tratado com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O tecido foi triturado com homogenizador

elétrico Polytron (tecido + Trizol) até a sua completa dissociação. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados nas amostras, que foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 13482 x g, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para um tubo limpo, adicionando em seguida 500 µL de isopropanol por tubo e foi incubada a temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos. Logo após, as amostras foram suavemente homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 13482 x g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,0 mL de etanol 75%. Mais uma vez o material foi centrifugado a 13482 x g por 5 minutos e logo após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Por fim, o pelete permaneceu secando por 15 minutos e em seguida foi ressuscitado em água ultrapura livre de RNase.

A concentração do RNA total foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para esta reação foi adicionado em um tubo estéril e RNA free 1 µg de RNA total, 1 µL de 10 X DNase I reaction buffer e 1 µL DNase I amplification grade (1 U/µL). A reação foi então incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida a DNase I foi inativada adicionando 1 µL de EDTA a 25 mM e a reação foi aquecida a 65°C por 10 minutos. Essa etapa foi realizada para remoção de possível contaminação com DNA genômico.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) e as reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Logo após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real foram realizadas utilizando o composto fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). Esse composto quando em solução apresenta pouca fluorescência, mas durante os ciclos da PCR o acúmulo do corante nas regiões específicas de ligação na dupla hélice faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação, em razão direta a formação dos amplicons, podendo desta forma ser detectada e quantificada.

Os primers utilizados nas reações de amplificação foram desenhados de acordo com as sequências dos genes Transportador de glicose 2 (*GLUT2*), Cotransportador sódio-glicose 1 (*SGLT1*), Transportador de aminoácidos *B⁰AT1*, Glutathione peroxidase 7 (*GPX7*), e Superóxido dismutase (*SOD*) depositadas no site www.ncbi.nlm.nih.gov (número de

acesso Z22932, XM_415247, XM_419056, NM_001163245.1, NM_205064.1, respectivamente) (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Sequências de primers utilizados nas reações de qRT - PCR

Gene	Amplicom ¹ (pb)	Temperatura (°C) ²	Sequências dos primers (5'-3')
<i>GLUT2</i>	180	60°C	CGCAGAAGGTGATAGAAGC ACACAGTGGGGTCCTCAAAG
<i>SGLT1</i>	160	60°C	GCCATGGCCAGGGCTTA CAATAACCTGATCTGTGCACCAGTA
<i>B⁰AT1</i>	153	60°C	TCTATTGAAGATTCGGGCAC AATGGTAAGCACAAGGTATGG
<i>GPX7</i>	140	60°C	TTGTAAACATCAGGGGCAAA TGGGCCAAGATCTTTCTGTAA
<i>SOD</i>	126	60°C	TGGACCTCGTTTAGCTTGTG ACACGGAAGAGCAAGTACAG
<i>β-actina</i>	136	60°C	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC

¹Amplicon, pares de base

²Temperatura de anelamento (°C).

Foram testados dois controles endógenos, os genes da *β-actina* e do *GAPDH*, sendo utilizado o gene da *β-actina* (número de acesso L08165), por ter apresentado melhor eficiência na reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas.

Os primers analisados foram adequados para as reações de PCR em tempo real. As eficiências de amplificação foram semelhantes para todos os genes de interesse, com 90% a 110% de eficiência. As análises da curva de dissociação não revelaram qualquer produto inespecífico ou formação de dímeros de primers, o que demonstra a confiabilidade dos dados estimados nas expressões de mRNA dos genes avaliados. A *β-actina* utilizada como controle endógeno não mostrou nenhuma diferença significativa entre as variáveis analisadas, o que confere eficiência a *β-actina* como controle endógeno.

2.6. Análise Estatística

Os dados obtidos no ensaio de sensibilidade foram analisados de forma descritiva.

Os parâmetros do ensaio de desempenho foram submetidos à análise de regressão, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003), sendo considerados significativos a 5% de probabilidade.

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de expressão relativa e os resultados são apresentados como unidade arbitrária (UA). Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrões. O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

O teste de Kruskal-Wallis a 1% de probabilidade foi utilizado para verificar se existem diferenças significativas nos resultados da microbiologia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento 1. Teste de Sensibilidade

Observou-se que não houve inibição de crescimento bacteriano em nenhum dos tratamentos propostos, onde os halos apresentaram 0,0mm de inibição bacteriana para *Salmonella spp.* e *Escherichia Coli*. O ácido cítrico utilizado nas análises apresenta pKa de 3,08 e foi diluído em solução salina com pH de 6,0. Pode-se inferir que o pH da solução salina pode ter interferido nos resultados, alterando o pH final nas placas, por isso a solução de ácido cítrico não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Estes dados podem ser reforçados ao analisar o experimento desenvolvido por Don (2008), que ao avaliar o crescimento de *Escherichia coli* em diversas concentrações de solução salina e em diferentes pH, observou que a solução salina não é capaz de impedir o crescimento desta bactéria e ressaltou que a *E. Coli* pode ser tolerante a condições de baixo pH (2,4), embora esta hipótese necessita de maiores estudos.

Estes resultados são diferentes dos obtidos por Ogita, Fujita e Tanaka (2009), que afirmaram que o ácido cítrico, possui características bacteriostáticas *in vitro*. Desta forma, maiores estudos devem ser realizados com o ácido cítrico *in vitro* a fim de avaliar os mecanismos de ação deste aditivo sobre o crescimento das bactérias patogênicas, além dos possíveis efeitos provocados pela diminuição do pH do meio às bactérias.

3.2. Experimento 2. Uso do Ácido Cítrico Como Promotor de Crescimento Para Codornas de Postura

Os valores das temperaturas observados se enquadraram na faixa de termoneutralidade para cada fase de vida das codornas.

Não foi observado efeito dos tratamentos sobre o consumo de ração ($P=0,33$). Contudo, observou-se que o ganho de peso ($P=0,01$) e à conversão alimentar ($P=0,05$) foram influenciados pelos níveis de ácido cítrico na dieta (**Tabela 5**). Como o ganho de peso foi maior nos tratamentos com ácido cítrico, sem alterações no consumo alimentar, a conversão alimentar também foi melhor nestes tratamentos. Em trabalho realizado por Islam et al. (2008), observaram-se que a adição de 0,5% de ácido cítrico nas dietas para frangos de corte também não provocou alterações no consumo alimentar; entretanto promoveu aumento no ganho de peso. Em experimentos desenvolvidos por Chowdhury et al. (2009) foi observado que a adição de 0,5% de ácido cítrico nas dietas de frangos de corte aumentou o ganho de peso e o consumo de ração em comparação às dietas basais.

Estes dados reforçam os resultados obtidos, demonstrando que o ácido cítrico influencia principalmente a taxa de ganho de peso das aves que consumiram o aditivo na dieta.

Tabela 5 – Desempenho de codornas japonesas em função dos níveis de ácido cítrico durante o período experimental

Parâmetros	Níveis de Ácido Cítrico (%)					Estatística	
	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	CV (%)	Valor P
Peso final (g/ave)	137,8	139,2	139,8	138,7	136,4	2,7	0,38
Consumo de ração (g/ave/)	462,0	479,2	467,1	468,9	463,6	3,6	0,33
Ganho de peso (g/ave/)	114,2	116,6	119,2	117,4	114,0	2,0	0,01
Conversão alimentar (g/g)	4,02	4,07	3,90	3,99	3,96	2,7	0,05

g= gramas, C. ração= consumo de ração, G. peso= ganho de peso, C. alimentar= conversão alimentar.

O ganho de peso aumentou à medida que se elevou os níveis de ácido cítrico (Ac) na dieta até 0,6% e pode ser representado pela equação $y = -12,68Ac^2 + 15,30Ac + 113,9$, com R^2 de 95% (**Figura 01**). A conversão alimentar também foi afetada quando se adicionou o aditivo na dieta das aves e pode ser observada pela equação $y = 0,085Ac^2 - 0,164Ac + 4,04$. Desta forma, foi possível estimar pela equação de regressão para ganho de peso, que o melhor nível de ácido cítrico na dieta é de 0,60%, visto que para a conversão alimentar, a equação não apresentou um bom ajuste.

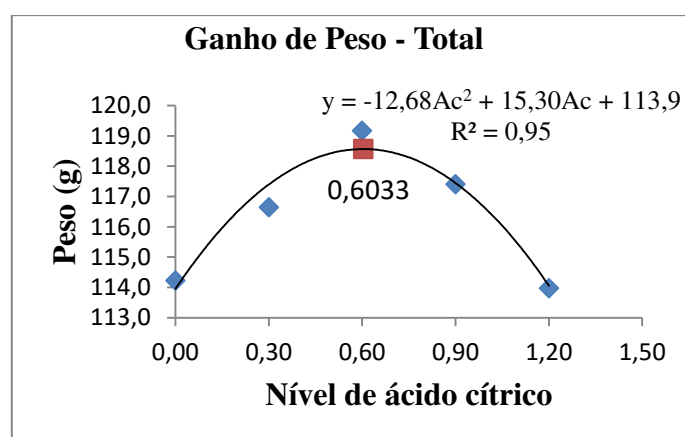


Figura 01. Ganho de peso das codornas em função dos níveis de ácido cítrico na dieta durante o período experimental.

Este maior ganho de peso observado é decorrente da maior eficiência no sistema absorptivo, haja vista que os enterócitos apresentam grande importância no metabolismo das

aves, por participarem do processo de digestão final dos alimentos e por possuírem proteínas transportadoras específicas localizadas nas membranas apical e basal, as quais são responsáveis pela absorção de nutrientes. Segundo a literatura, para absorver os aminoácidos e os metabólitos dos carboidratos, o intestino dispõe de mecanismos transportadores eficientes. Como é o caso do cotransportador sódio-glicose, responsável pela absorção de glicose e do transportador de aminoácidos (*B⁰ATI*), que está presente na borda em escova, e está relacionado à absorção de todos os aminoácidos neutros.

Sendo assim, a melhora no desempenho observada através do aumento no ganho de peso e na eficiência alimentar, pode estar relacionada com a expressão dos transportadores intestinais de aminoácidos e de glicose; já que, a expressão dos genes *B⁰ATI* (P=0,01) e *SGLT1* (P=0,01) foi significativamente maior em aves que foram alimentadas com dietas contendo ácido cítrico (**Tabela 6**). Este aumento no ganho de peso das codornas foi de aproximadamente 2,3% em relação ao tratamento sem adição de ácido cítrico (114,2 vs. 116,8 g/ave, respectivamente).

Tabela 6 – Efeito da suplementação de ácido cítrico sobre a expressão gênica no intestino de codornas

Transportadores	Níveis de ácido cítrico (%)						Valor P
	0,0		0,6		1,2		
	Média ²	DP	Média	DP	Média	DP	
<i>B⁰ATI</i>	0,0038 ^B	0,001	0,0186 ^A	0,005	0,0307 ^A	0,013	0,01
<i>SGLT1</i>	0,019 ^B	0,006	0,026 ^B	0,004	0,120 ^A	0,010	0,01
<i>GLUT2</i>	0,0017	0,0002	0,0018	0,0004	0,0020	0,0005	0,54
<i>GPX 7</i>	0,0182 ^A	0,009	0,002 ^B	0,001	0,003 ^B	0,001	0,01
<i>SOD</i>	1,3483 ^A	0,33	1,5331 ^A	0,13	0,3455 ^B	0,06	0,01

Médias em uma mesma linha seguidas por letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey.

B⁰ATI: Transportador de aminoácidos; *SGLT1*: Cotransportador sódio-glicose 1; *GLUT 2*: Transportador de glicose 2; *GPX7*: Glutathione peroxidase 7; *SOD*: Superoxido dismutase.

²Expresso como Unidades Arbitrárias (UA).

Não foram observadas diferenças significativas (P=0,54) para o transportador de glicose (*GLUT2*), possivelmente porque os níveis de ácido cítrico da dieta não tenham sido suficientes para afetar o transportador de glicose. Foi observado ainda que as aves que foram alimentadas com dieta suplementada com ácido cítrico apresentaram (P=0,01) menor expressão dos genes *GPX7* e *SOD*. Estas enzimas antioxidantes estão relacionadas ao combate das espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo e assim agem contra o estresse oxidativo. Aumentos na expressão e na atividade de tais enzimas em aves têm sido

relacionados a situações em que os animais são expostos ao estresse, a exemplo de aves expostas ao estresse por calor (Del Vesco et al., 2015).

Considerando que as aves alimentadas com ácido cítrico apresentaram menor expressão de mRNA *GPX7* e mRNA *SOD*, sugere-se que menor quantidade e ação de mecanismos antioxidantes são necessários, nesta condição. Este resultado pode ser devido à melhora no ambiente intestinal promovida pelo ácido cítrico. Como as codornas que consumiram o aditivo não necessitaram aumentar a produção de *GPX7* e *SOD*, maior quantidade de nutrientes/energia estava disponível para outras funções orgânicas, tais como o crescimento, conseqüentemente; o ganho de peso destas aves foi melhorado.

Em relação ao peso relativo dos órgãos, observou-se redução no peso do fígado ($P=0,01$) e no comprimento do intestino delgado ($P=0,03$) com suplementação a partir de 0,6% de ácido cítrico na dieta (**Tabela 7**). O peso do proventrículo, moela e pâncreas não foram influenciados pela suplementação do ácido cítrico ($P\geq 0,05$). Estes resultados, associados com os da expressão dos genes *GPX7* e *SOD* demonstram que os animais que consumiram ácido cítrico na dieta, provavelmente tiveram que metabolizar menos substâncias relacionadas ao sistema imune para se proteger, influenciando, conseqüentemente, o peso relativo do fígado. O peso relativo do fígado pode ser representado pela equação $y = -0,3317Ac^2 + 0,0434Ac + 2,3215$, com R^2 de 86% (**Figura 02**), enquanto que o comprimento do intestino delgado pode ser representado pela equação $y = 3,0222Ac^2 - 6,17Ac + 46,18$, com R^2 de 68% (**Figura 03**).

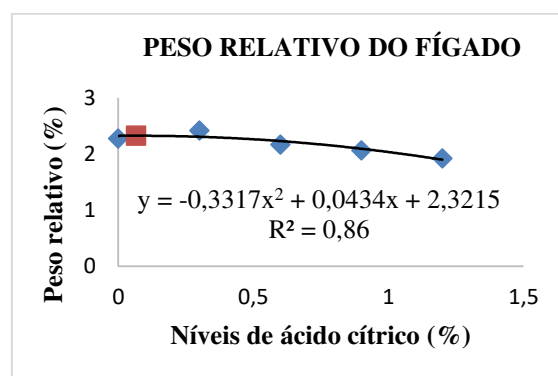


Figura 02. Peso relativo do Fígado em função dos níveis de ácido cítrico.

O menor comprimento do intestino delgado das aves que consumiram o ácido cítrico (45,72 vs. 43,51cm, respectivamente) possivelmente também seja pela melhor saúde intestinal, visto que elas necessitaram utilizar de menos os mecanismos de defesa,

indicando que absorveram melhor os nutrientes, já que a expressão dos transportadores de glicose e aminoácidos foi maior nestas codornas.

Tabela 7 – Peso relativo de vísceras, pH do ceco, comprimento intestinal e resistência óssea

Parâmetros	Níveis de Ácido Cítrico					Estatística	
	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	CV(%)	Valor P
Peso relativo (%)							
Fígado	2,276	2,416	2,167	2,062	1,921	11,5	0,01
Próventrículo	0,435	0,482	0,420	0,438	0,441	14,2	0,09
Moela	2,833	2,967	2,861	2,881	2,945	10,8	0,73
Pâncreas	0,261	0,253	0,253	0,238	0,225	16,5	0,14
Intestino delgado (cm)	45,719	45,906	42,419	43,300	43,207	8,5	0,03
pH do ceco	6,663	6,448	6,529	6,533	6,616	6,3	0,63
Resistência óssea							
Flexão (newtons)	33,204	35,661	34,584	35,226	33,519	18,33	0,91
Diâmetro (mm)	2,755	2,774	2,723	2,768	2,710	4,45	0,75

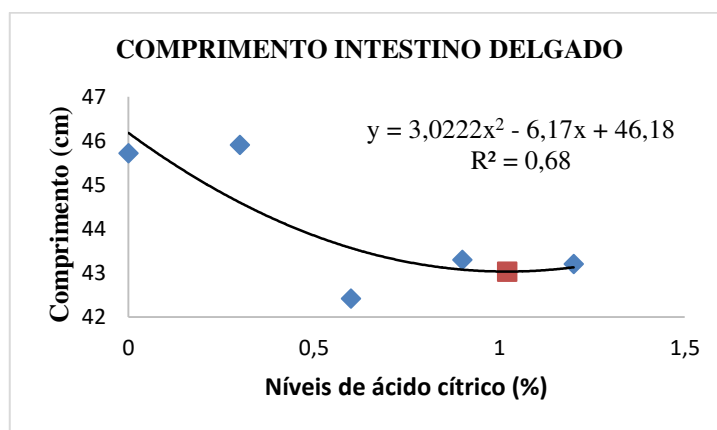


Figura 03. Comprimento do intestino delgado em função dos níveis de ácido cítrico.

Foi observado que o pH do ceco não foi influenciado pelos tratamentos (P=0,63). Como o ácido cítrico possui $pka \cong 3,08$, é possível que o ácido cítrico atue na redução do pH no estômago, entretanto, após o estômago, o pH é neutralizado por substâncias secretadas no intestino, elevando o pH para que não lesione os segmentos do duodeno,

jejuno e íleo. Consequentemente, o pH do ceco das aves tinha se elevado; por isso, provavelmente, o pH cecal não foi influenciado pelos tratamentos.

Como o pH do ceco das codornas não foi influenciado pelos níveis de ácido cítrico na dieta, os dados de resistência óssea também não foram afetados ($P \geq 0,05$). Sabe-se que a diminuição do pH no estômago, geralmente melhora a absorção de cálcio no organismo de aves, contudo, como não houve diferenças quanto ao pH do ceco, a flexibilidade e diâmetro dos ossos não sofreram a influência pela redução do pH intestinal. Tem sido relatado que a absorção de cálcio no intestino está relacionada ao pH e o tempo de passagem, bem como o cálcio que se torna mais solúvel em meio ácido (Bronner, 1998; Grüdtner et al., 1997).

Não foram observadas diferenças quantitativas ($P \geq 0,05$) no efetivo de bactérias no organismo de codornas em função dos níveis de ácido cítrico (**Tabela 8**). As codornas foram criadas em um ambiente com cama reutilizada para simular um ambiente de criação comercial, a fim de obter resultado mais próximo ao que se tem em situações de campo.

Tabela 8 – Microbiologia relacionada ao jejuno e ceco em função dos tratamentos

Parâmetros	Níveis de Ácido Cítrico (%)					Estatística
	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	Valor P
Jejuno						
<i>Lactobacillus</i>	7,00	7,06	6,97	7,82	7,91	ns
<i>Streptococcus</i>	3,74	3,89	3,17	4,53	4,32	ns
<i>Escherichia coli</i>	4,84	3,76	3,95	3,34	3,29	ns
<i>Enterococcus</i>	3,07	3,38	3,47	3,62	3,57	ns
Ceco						
<i>Lactobacillus</i>	8,71	9,23	8,69	9,11	8,96	ns
<i>Escherichia coli</i>	2,82	2,67	2,13	2,25	2,12	ns

Sabe-se que o pH é um dos principais fatores que poderiam influenciar no quantitativo de bactérias. Observou-se que o pH no ceco se manteve sempre acima de 6,4; ao mesmo tempo que do ao sair do estômago o pH tende a ser neutralizado. Associa-se a isso a resistência das bactérias patogênicas a pH baixo e um microclima ideal ao crescimento de *Lactobacillus*. De acordo com o relatado por Richard e Foster (2004), a *Escherichia coli* possivelmente tolera ambientes com pH próximo a 2,0 e *Enterococcus* e

Streptococcus suportam ambientes com pH também baixos. Os *Lactobacillus* são considerados intrinsicamente resistentes a pH ácido, são sensíveis a pH abaixo de 3 (Corcoran et al., 2005).

Ao contrário do que se esperava, o menor pH do ácido cítrico não influenciou o quantitativo de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* no organismo das codornas. Estes dados estão contraditórios aos obtidos por Santos (2013) que ao avaliar ácidos orgânicos para codornas, observou diferenças significativas no quantitativo total de bactérias avaliando outros ácidos orgânicos.

A concentração microbiana do conteúdo intestinal das codornas foi de 10^9 UFC/g (Log). Todos apresentaram características típicas de bactérias produtoras de ácido lático, como morfologia de bastonetes ou cocos, coloração Gram-positivo e teste de catalase com resultado negativo. Destes isolados, foram selecionadas amostras de microrganismos os quais se apresentavam como bastonetes (sugerindo microrganismos do gênero *Lactobacillus*) para que fosse realizada a identificação por meio de técnicas moleculares. Estes resultados se mostraram semelhantes àqueles demonstrados por outros pesquisadores, confirmando a seletividade do meio de cultura utilizado para o isolamento inicial (MRS - Difco).

Seis tipos morfológicos diferentes de colônias foram observados nas placas de ágar MRS, cultivado sob anaerobiose, a partir da inoculação de material fecal de codornas. A maior parte dos microrganismos isolados demonstrou crescimento sob as condições respiratórias investigadas (anaerobiose, aerobiose e microaerofilia), porém com melhor desenvolvimento sob microaerofilia ou anaerobiose e menor sob aerobiose. Estes resultados relacionam-se às baixíssimas concentrações de oxigênio existentes nos intestinos de codornas e, também, relativos às características dos microrganismos do gênero *Lactobacillus*.

A presença de bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, catalase negativa confirma a ocorrência de bactérias do gênero *Lactobacillus* observados em outros trabalhos, inclusive envolvendo outros animais de criação (Guillot, 2001; Gong et al., 2002; Zhu et al., 2002; Apajalahti et al., 2004 e Macari e Furlan, 2005). Desta forma, observa-se que os intestinos das aves apresentam características ideais para o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus*, indicativo de melhoria da saúde intestinal das aves. O desenvolvimento destas bactérias permite maior proteção intestinal e, consequentemente, menor é a possibilidade de lesões causadas por bactérias oportunistas (Muniz et al., 2013).

Quando foram avaliadas amostras de *Lactobacillus* spp. isolados a partir do conteúdo intestinal de codornas, oriunda de criação intensiva e identificados pelo perfil de fermentação de carboidratos (*kit API 50 CHL*, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), verificou-se que os mesmos apresentaram crescimento satisfatório, após três passagens em caldo MRS, incubado sob anaerobiose a 37°C, durante 24-48 horas. As culturas inoculadas em ágar MRS apresentaram crescimento nas placas indiferente ao tipo de metodologia adotada para a semeadura (espalhamento em superfície com auxílio da alça de *Drigalski*, esgotamento por estrias e técnica *pour-plate*).

Os resultados do teste respiratório das culturas de *Lactobacillus* spp. cultivadas sob aerobiose, microaerofilia e anaerobiose, se mostraram bem diversificados reforçando a habilidade das bactérias estudadas em crescer sob diferentes condições de cultivo. Entretanto, da mesma forma que demonstrada por Cerqueira (2000), os resultados obtidos com as amostras de microrganismos produtores de ácido láctico isolados do conteúdo intestinal das codornas, foram melhores quando as mesmas foram incubadas sob condições de anaerobiose. Este fato também pode ser justificado pelas baixíssimas concentrações de oxigênio normalmente presentes nos locais em que os microrganismos se apresentam em maior número no TGI dos animais.

O crescimento sob diferentes condições de cultivo apresentado por microrganismos isolados no presente trabalho pode significar uma grande vantagem evolutiva para estas amostras, facilitando a sua adaptação e sobrevivência em diferentes ecossistemas; principalmente quando se refere à população de bactérias que trazem benefícios e, por conseguinte, ocasionar maior proteção às aves e proporcionar maior crescimento.

Os microrganismos isolados e caracterizados como bastonetes Gram-positivo, catalase negativa, com crescimento anaeróbico facultativo apresentaram três ou mais cópias da região intergênica 16S-23S em seu DNA (amplificação de três ou mais segmentos de DNA). Este fato é indicativo de espécies de bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* e *Weissella* (Tannock, Timisjarvi, Rodtong, 1999). Por outro lado, a presença de cocos de crescimento facultativo, Gram-positivo, catalase negativa (n=19, ou seja, 38,00%) possuindo, no mínimo, uma e duas cópias da região intergênica 16S-23S em seu DNA (amplificação de um ou mais e dois ou mais segmentos de DNA) sugere o isolamento de espécies pertencentes aos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, respectivamente (Tannock, Timisjarvi, Rodtong, 1999). Destaca-se que estes dois gêneros microbianos anteriormente citados, não foram utilizados neste trabalho.

A **Figura 04** apresenta exemplos de fotos dos géis de agarose relativos a PCR-ARDRA 16S-23S rRNA, realizadas para amplificação desta região intergênica utilizada para a identificação dos microrganismos isolados.

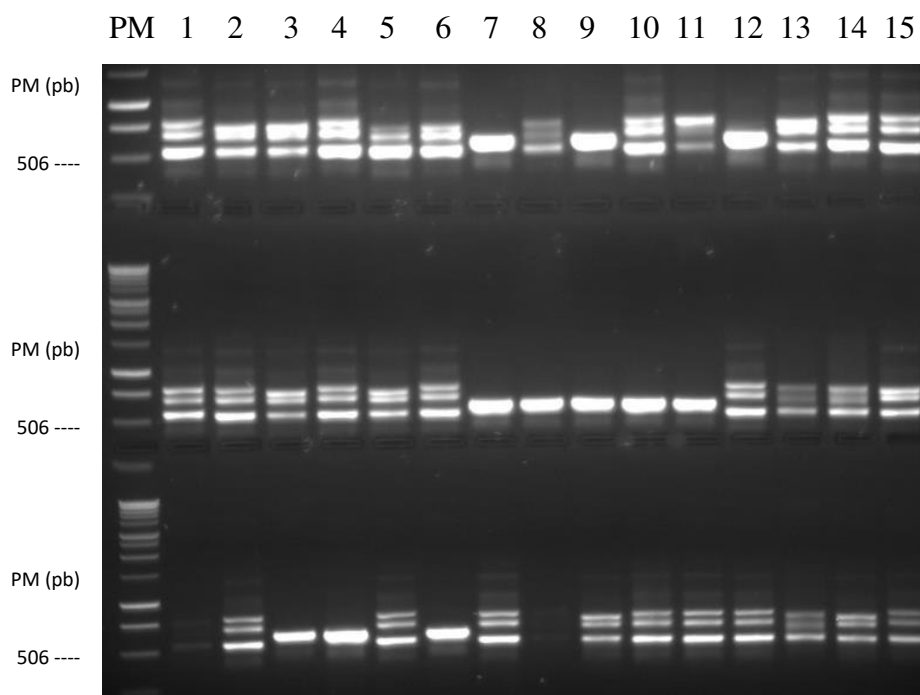


Figura 04. Perfil eletroforético dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, das regiões intergênicas 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus*, em gel de agarose 1,4%.

PM: padrão de peso molecular 1 Kb (Promega). Amostras aplicadas nas canaletas: numeração de 1 à 15.

A região intergênica 16S-23S representada como três bandas de DNA, com pesos moleculares diferentes, sugere material genético de *Lactobacillus* spp. indicando que existem três versões diferentes (ou mais) destes genes no genoma destas bactérias. Isto ocorre porque uma banda pode representar uma ou mais regiões intergênicas com pesos moleculares semelhantes, amplificadas na reação de PCR. Como estes fragmentos de DNA apresentam velocidade de migração muito parecida durante a eletroforese, ao final desta análise, os mesmos irão se localizar muito próximos, produzindo a imagem de uma só banda. A mesma discussão pode ser aplicada onde ocorreu a amplificação de uma e duas bandas no gel de agarose, sugerindo a presença de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., respectivamente.

Foram confirmadas as seguintes espécies: *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii* e *Lactobacillus vaginalis*. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois *Lactobacillus* spp. são bactérias produtoras de ácido láctico,

encontradas em grandes quantidades no TGI de codornas e diversos outros animais (Guillot, 2001; Gong *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002; Apajalahti, Kettunes e Graham, 2004 e Macari e Furlan, 2005). A identificação de *Lactobacillus* por meio de estudos do DNA ribossomal 16S (rDNA) provém uma base acurada para sua análise filogenética e identificação. Uma identificação perfeita seria obtida por meio do sequenciamento de todo o gene rDNA 16S, porém isto significa que cerca de 1,5 kp de DNA tivessem de ser sequenciados (Tannock, Timisjarvi e Rodtong, 1999).

Apesar dos resultados da reação de PCR-ARDRA 16S-23S rRNA e das análises de coloração morfo-tintoriais indicarem que algumas amostras podem pertencer a gêneros, como *Lactobacillus* e *Streptococcus* - não mostradas neste trabalho - as mesmas foram consideradas como bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), pois o perfil de restrição enzimática de produto de PCR-ARDRA 16S-23S das mesmas não permitiu a identificação ao nível de espécie. Estas amostras poderão ser sequenciadas no futuro.

Já as figuras (**Figura 05, 06, 07 e 08**), mostram exemplos de fotos de géis de agarose após a restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rRNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie.

A presença em elevado número de *Lactobacillus* na microbiota do TGI de codornas, foi descrita por diversos autores. A presença destes microrganismos nos intestinos de codornas pode ser considerada extremamente benéfica, principalmente por se considerar *Lactobacillus* como uma bactéria potencialmente probiótica (Fuller, 1988; Fuller, 1989 e Guillot, 2001). Os efeitos desejáveis destas bactérias neste ecossistema podem ser causados por produção de ácidos láctico e acético (este em menor quantidade), além da redução do pH local, o que inviabiliza o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, como as putrefativas e as patogênicas (Salminen e Von Wright, 1993), principalmente *E. Coli*, *Streptococcus* e *Salmonella*.

As espécies de bactérias compreendidas pelo gênero *Lactobacillus* possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum. Elas são bastonetes Gram-positivo, catalase negativa, não móveis, não formadoras de esporos, sem citocromo, anaeróbias facultativas, aerotolerantes, nutricionalmente exigentes, tolerantes à acidez, com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto do seu metabolismo de carboidratos (Danielsen, 2003).

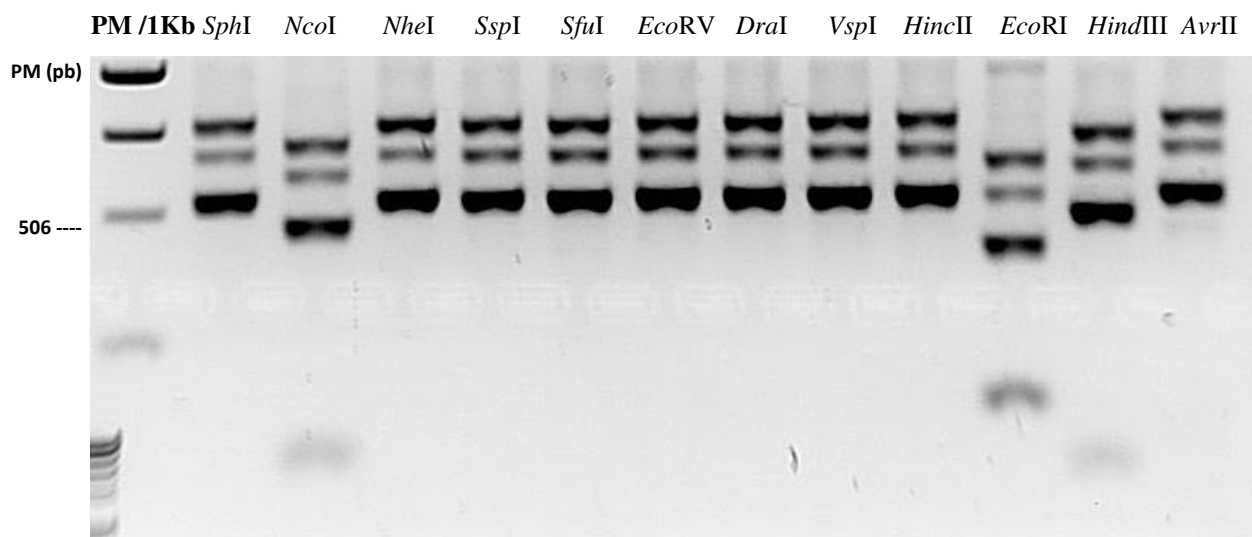


Figura 05. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. *Lactobacillus acidophilus*.

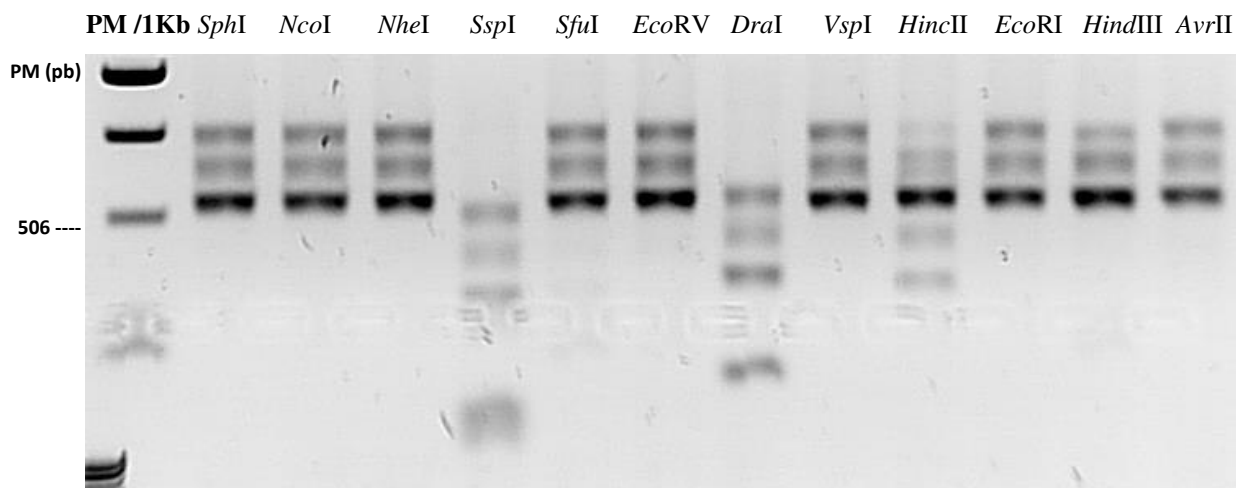


Figura 06. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. *Lactobacillus salivarius*.

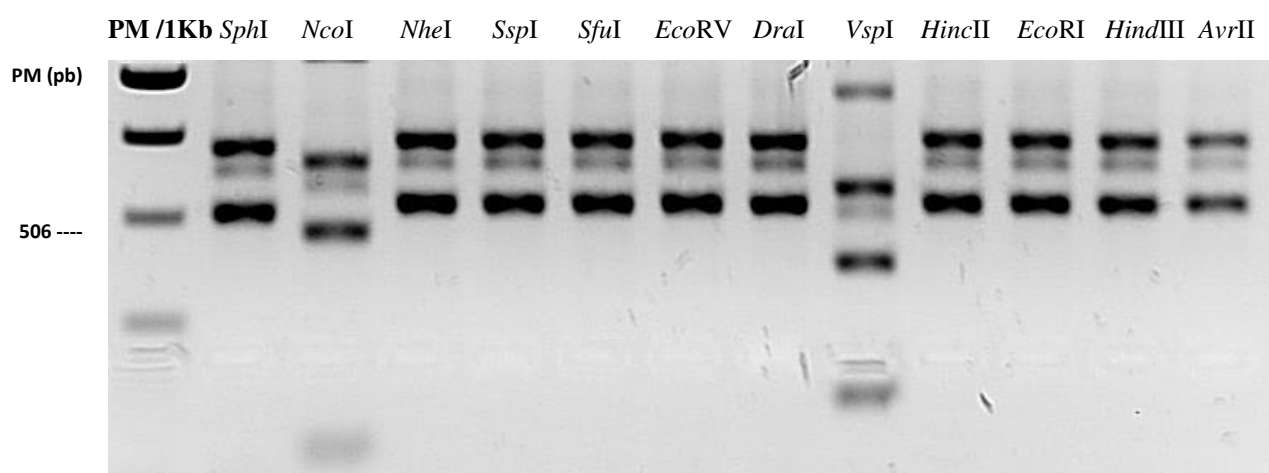


Figura 07. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. *Lactobacillus reuteri*.

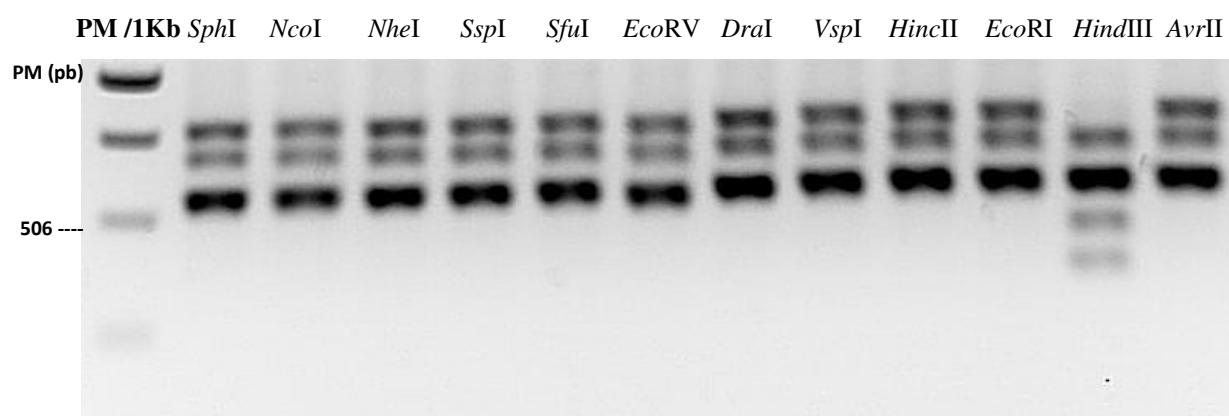


Figura 08. Gel de agarose (1,4%) contendo o perfil de restrição enzimática dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos ao nível de espécie. *Lactobacillus johnsonii*.

Em relação ao metabolismo, de acordo com a classificação de Salminen (1999), as espécies podem ser homofermentativos obrigatórios: convertem hexoses em ácido láctico via Embden-Meyerhof-Parnas, sendo incapazes de utilizar as pentoses;

- heterofermentativos facultativos: fermentam hexoses em ácido láctico, e no caso de algumas espécies e sob certas circunstâncias, em ácidos láctico, acético e fórmico e etanol; sendo capazes de fermentar pentoses em ácidos láctico e acético;

heterofermentativos obrigatórios: utilizam hexoses para produzir ácidos láctico e acético, etanol e dióxido de carbono; e pentoses para obter ácidos láctico e acético.

Em relação à diversidade de *Lactobacillus* (Figura 09 e 10), foram identificadas no conteúdo intestinal das codornas estudadas: *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii* e *Lactobacillus vaginalis*.

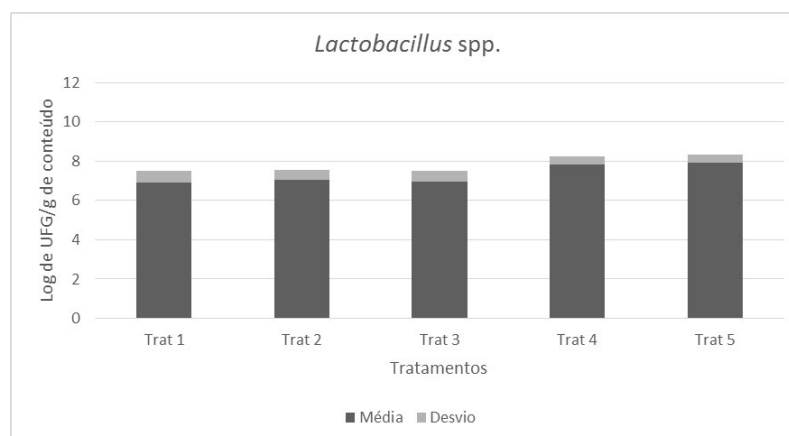


Figura 09. Concentração de espécies identificadas de *Lactobacillus* spp., isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Jejuno.

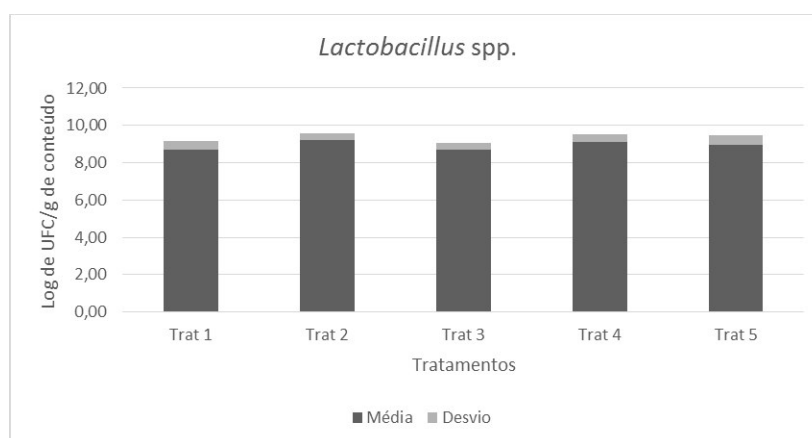


Figura 10. Concentração de espécies identificadas de *Lactobacillus* spp., isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Ceco.

Sabe-se também, que o ambiente influencia a sequência de colonização dos sítios do TGI. Isto pode estar relacionado com as condições gerais de manejo, sanidade e também da dieta (Macari e Furlan 2005). Foram observadas diferenças, não estatisticamente significativas, em relação à *Escherichia coli* das microbiotas fecais dos animais estudados,

principalmente no jejuno em função dos tratamentos realizados. Estas foram identificadas pelo perfil de fermentação de carboidratos (kit API 20 E, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Possivelmente, a redução do pH induzido pelo ácido cítrico não foi capaz de controlar ou influenciar o quantitativo de *E. coli* (**Figura 11 e 12**). Acrescenta-se a isso o fato de que a *E. coli* tolera ambientes com baixo pH, por isso não houve diferenças entre os tratamentos.

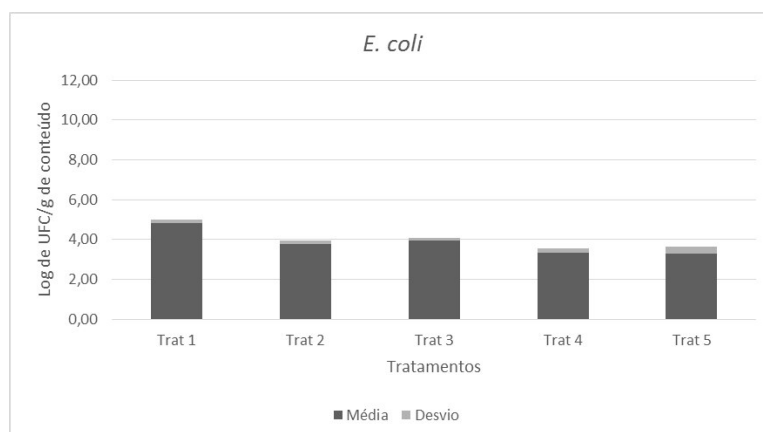


Figura 11. Concentração *E. coli*, isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Jejuno.

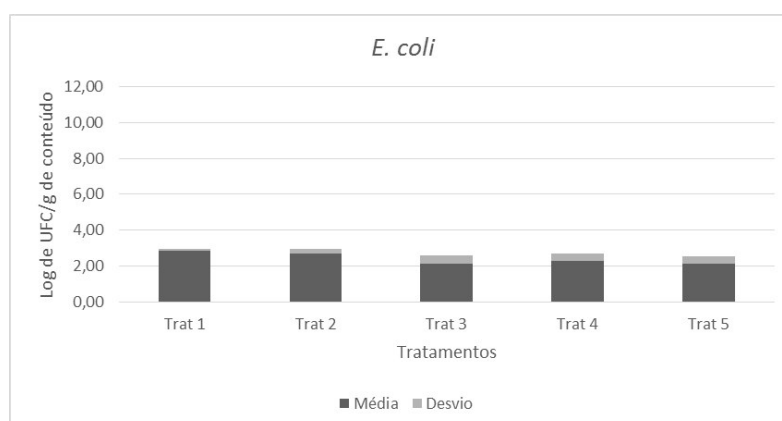


Figura 12. Concentração de espécies identificadas de *Lactobacillus* spp., isoladas do conteúdo fecal de codornas em função do tratamento – Ceco.

O quantitativo de bactérias *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli* não foram alterados em função dos níveis de ácido cítrico testados (0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2%). A adição do ácido não prejudicou o crescimento de *Lactobacillus* no sistema digestório das codornas, fato importante a ser considerado, visto que são as principais bactérias que atuam auxiliando o organismo no combate das bactérias patogênicas. Os

efeitos do ácido cítrico sobre as bactérias patogênicas ainda não puderam ser totalmente esclarecidos. Por isso, mais pesquisas devem ser realizadas para verificar o mecanismo de atuação do ácido cítrico sobre as bactérias patogênicas, bem como níveis superiores aos testados neste experimento.

Vale salientar ainda que o experimento foi realizado com aves de postura, objetivando melhorar a saúde intestinal e melhorar a defesa contra bactérias patogênicas no organismo das codornas, permitindo que estas cheguem ao peso ideal dentro da idade adequada, bem como em melhor estado fisiológico para iniciar a postura. Deste modo, o ácido cítrico foi capaz de melhorar o crescimento das aves e atuar de forma positiva no sistema de oxidação do organismo, exercendo seus efeitos positivos.

4. CONCLUSÕES

O ácido cítrico não inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonela* em ensaios *in vitro*. O ácido cítrico melhora a expressão do transportador de aminoácidos e Cotransportador sódio-glicose 1. Os níveis de ácido cítrico testados não controlam o crescimento de *Streptococcus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* no organismo de codornas. O melhor nível de ácido cítrico em dietas para codornas de postura (*Coturnix coturnix japonica*) em crescimento alojadas no nordeste brasileiro é de 0,60%.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APAJALAHTI, J.; KETTUNES, A; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 223-232, 2004.
- BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON M.; DUNICAN L. K.; GANNON, F. The 16/23s ribossomal spacer region as a target for DNA probes to identify *Eubacteria*. **PCR Methods and Applications**, v.1, p.51-56, 1991.
- BRONNER, F. Calcium absorption – a paradigma for mineral absorption. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, V. 128, p. 917-920, 1998.
- CERQUEIRA, M. M. O. P. *Isolamento, seleção e efeitos de um probiótico na modulação da infecção por Eimeria acervulina e no desempenho de frangos de corte*. 2000. 95 p. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2000.
- CHOWDHURY, R.; ISLAM, K.M. S.; KHAN, M. J.; KARIM, M. R.; HAQUE, M. N.; KHATUN, M.; PESTI, G.M. Effect of citric acid, avilamycin and their combination on the performance, tibia ash and immune status of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 88, p. 1616-1622, 2009.
- COON, C. N., LESKE, K. L., AKAVANICHAN, O, T. K. Effect of Oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. **Poultry Science**, Champaign, v. 69, n. 5, p. 787-793, 1990.
- CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Survival of Probiotic Lactobacilli in acid environments is enhanced in presence of metabolized sugars. **Applied and environmental microbiology**, v.71, p. 3060-3067, 2005.
- DANIELSEN, N.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 82, p. 1-11, 2003.
- DEL VESCO, A. P.; GASPARINO, E.; GRIESER, D. O.; ZANCANELA, V.; VOLTOLINI, D. M.; KHATLAB, A. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; SOARES, M. A. M.; OLIVEIRA NETO, A. R. Effects of methionine supplementation on the expression. Of protein deposition- related genes in acute heat stress- exposed broilers, **Plos one**, 2015.
- DON, S. M.; Optimal conditions for growth of *E. Coli*. **Biology EEI**, Mrs Gibson, p.2-18, 2008.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R.; COLE, C.B. The Scientific Basic of the Probiotic Concept. In: **Probiotic: Theory and Applications**. Marlow: Chalcombe Publications, p. 1-14, 1988.

GONG, J., FORSTER, R. J.; YU, H.; CHAMBERS, J. R.; SABOUR, P. M.; WHEATCROFT, R.; CHEN, S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiol.** 2002.

GRÜDTNER, V. S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A. L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas, v. 37, p. 143-150, 1997.

GUILLOT, J.F. Como utilizar correctamente los probióticos en avicultura. **Avicul. Indust.**, v. 19, p. 33-36, 2001.

ISLAM, M. Z.; KHANDAKER, Z. H.; CHOWDHURY S. D.; ISLAM, K. M. S. Effect of citric acid and acetic acid on the performance of broilers. **J. Bangladesh Agril. Univ.** 6, p.315-320, 2008.

MACARI, M.; FURLAN, R.L. Probióticos. Conferência de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, SP. **Anais... Facta**, v. 1, p.53-72, 2005.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 3, de 17 de janeiro de 2000. Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para Abate Humanitário de Animais de Açougue. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, Distrito Federal, Seção 1, p. 14, 24 de janeiro de 2000.

MUNIZ, E. C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M. C.; WESTPHAL, P.; KURITZA, L. N.; SANTIN, E. Probióticos na ração para o controle de *Salmonella minnesota* em frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.3, p.52-60, 2013.

OGITA, A., FUJITA, K. I., TANAKA, T. Salinomycin and citric acid in combination demonstrate bactericidal activity against Gram-negative bacteria. **Ann. Microbiol.** p.59, 2009.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., DONZELE, J. L., GOMES, P. C., OLIVEIRA, R. F. M., LOPES, D. C., FERREIRA, A. S., BARRETO, S. L. T., EUCLIDES, R. F. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos – Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. UFV, Viçosa, p. 252, 2011.

SALMINEN, S. Probiotics: how should they be defined? **Trends Food Sci. Technol.**, v. 10, p. 107-110, 1999.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 442 p., 1993.

SANTOS, L. M. dos. Digestibilidade de nutrientes e desempenho de codornas japonesas suplementadas com ácidos orgânicos após pico de postura. 2013. 74 p. **Tese** (Doutorado em Nutrição de não ruminantes). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.

TANNOCK, G. W.; TIMISJARVI, T. A.; RODTONG, S. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro-intestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rDNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.4264-4267, 1999.

TILSALA, A. T.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S–23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 35, 49–56, 1997.

ZHU, Y. Y., ZHONG T., PANDYA, Y., JOERGER, R. D. 16S rRNA-based analysis of microflora from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002.