

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**EFEITO DE DIFERENTES PROGRAMAS DE SUPLEMENTAÇÃO DE UM
PRODUTO À BASE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUBSTÂNCIA HÚMICA NA
PERFORMANCE, RESPOSTA IMUNE E MORFOMETRIA INTESTINAL DE
FRANGOS DE CORTE**

PATRICIA CRUZ ARISTIMUNHA

Médica Veterinária – UFSM
Mestre em Zootecnia – UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor
em Zootecnia Área de Concentração em Produção Animal

Porto Alegre, RS, Brasil
Março de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Aristimunha, Patricia Cruz

Efeito de diferentes programas de suplementação de um produto à base de ácidos orgânicos e substância húmica na performance, resposta imune e morfometria intestinal de frangos de corte. / Patricia Cruz Aristimunha. -- 2017.

93 f.

Orientador: Andrea Machado Leal Ribeiro.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Ácido húmico. 2. Butirato de sódio. 3. Desempenho zootécnico. 4. Imunidade. 5. Morfometria intestinal. I. Ribeiro, Andrea Machado Leal , orient. II. Título.

PATRICIA CRUZ ARISTIMUNHA
Médica Veterinária e Mestre em Produção Animal

TESE

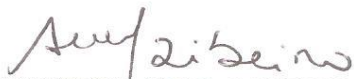
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTORA EM ZOOTECCNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 31.03.2017
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 17.05.2017
Por



ANDREA MACHADO LEAL RIBEIRO
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientadora



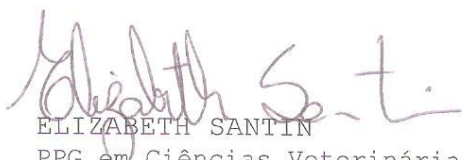
PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



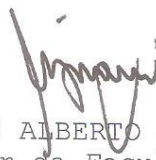
CLAUDIO WAGECK CANAL
PPG em Ciências Veterinárias/UFRGS



LUCIANO TREVIZAN
PPG Zootecnia/UFRGS



ELIZABETH SANTIN
PPG em Ciências Veterinárias/UFPR



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e suporte nos momentos difíceis, e por entenderem os meus momentos de ausência em suas vidas;

Aos mestres da UFRGS, em especial à professora Andrea Machado Leal Ribeiro, minha orientadora, pela oportunidade de me tornar doutora.

À toda equipe do LEZO e colegas de pós-graduação pela acolhida, amizade, incentivo, apoio, confiança e por superarem minhas expectativas em relação ao convívio e trabalho durante este período;

A todos na NC State University que me acolheram e me ajudaram durante meu período de intercâmbio, em especial aos professores Ramon Malheiros e Peter Ferket pela orientação durante meus experimentos.

À toda equipe e intercambistas do Prestage Poultry Science Department da NC State University pela ajuda nos experimentos e trocas de experiências.

EFEITO DE DIFERENTES PROGRAMAS DE SUPLEMENTAÇÃO DE UM PRODUTO À BASE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUBSTÂNCIA HÚMICA NA PERFORMANCE, RESPOSTA IMUNE E MORFOMETRIA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE¹

Autora: Patricia Cruz Aristimunha

Orientadora: Andrea Machado Leal Ribeiro

Resumo: As limitações ao uso de antibióticos promotores de crescimento vêm aumentando a procura por aditivos substitutos para manter a performance animal, a saúde intestinal e a resposta imune de frangos de corte. Este experimento foi conduzido para comparar o efeito e a dose resposta do produto Ava Cid P (composto por substância húmica, butirato de sódio 30% protegido e uma pequena porção de acidificantes) suplementado na dieta, sobre a performance, resposta imune e saúde intestinal de frangos de corte. O experimento seguiu um design inteiramente casualizado, envolvendo um arranjo fatorial 2 x 5 (2 sexos e 5 tratamentos) com 7 repetições de 15 aves por tratamento. Os tratamentos seguiram a suplementação em diferentes fases de 1 a 49 dias: 1) Controle: dieta basal sem nenhuma suplementação; 2) AVA₁₋₂₁: aves receberam 0,91 kg/t de Ava Cid P de 1 a 21 d; 3) AVA₁₋₃₅: 0,91 kg/t de Ava Cid P de 1-21 d e 0,45 kg/t de 22-35 d; 4) AVA₁₋₄₂: 0,91 kg/t de Ava Cid P de 1 a 21 d e 0,45 kg/t de 22- 42 d; 5) AVA₁₋₄₉: 0,91 kg/t de Ava Cid P de 1 a 21 d, 0,45 kg/t de 22-35 d e 0,23 kg/t de 36-49 d. A suplementação com Ava Cid P não influenciou a performance de machos e fêmeas, nem mesmo a densidade de células caliciformes ($P > 0,05$). No entanto, o Ava Cid P foi capaz de modificar a morfometria intestinal, aumentando a altura de vilosidades aos 9 e 35 d ($P < 0,05$). A área superficial aparente dos vilos e altura de vilos, nas aves que receberam Ava Cid P durante todas as fases experimentais, foi superior à das aves suplementadas somente na fase inicial. No íleo, a área superficial aparente dos vilos também foi superior nas aves suplementadas aos 9 d. Além disso, a expressão do gene para mucina 2 (MUC2) e para o fator de necrose tumoral (TNF- α) diminuiu nas aves recebendo Ava Cid P aos 21 d ($P < 0,05$), mas não foram observadas diferenças estatísticas para interleucina-1 beta e interleucina-10. Os resultados sugerem que Ava Cid P pode alterar a expressão de mRNA de algumas citocinas e MUC2 e a morfometria intestinal de frangos de corte, aumentando a superfície aparente e a altura dos vilos, o que demonstra a potencialidade do produto como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento.

Palavras-chave: Ácido húmico, Butirato de sódio, Desempenho zootécnico, Imunidade, Morfometria intestinal.

¹Tese de Doutorado em Zootecnia - Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93 p.). Março, 2017.

EFFECT OF DIFFERENT DIETARY SUPPLEMENTATION PROGRAMS OF A PRODUCT CONSISTED OF ORGANIC ACIDS AND HUMIC SUBSTANCE ON PERFORMANCE, IMMUNE RESPONSE AND GUT MORPHOLOGY OF BROILER CHICKENS¹

Author: Patricia Cruz Aristimunha

Adviser: Andrea Machado Leal Ribeiro

Abstract: The limitations of the antibiotic growth promoter's (AGP) usage have been increasing the search for new products to improve poultry performance, gut healthy and immune response. This experiment was conducted to compare the effect and dose response of Ava Cid P (consisted of a humic substance, coated sodium butyrate 30% and a small acidifier portion) diet supplementation on performance, immune response and gut health of broilers. Five dietary regimens were used: 1) birds didn't receive Ava Cid P in any phase (Control), 2) birds received 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d (AVA₁₋₂₁), 3) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d and 0.45 kg/t from 22 to 35 d (AVA₁₋₃₅), 4) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d and 0.45 kg/t from 22 to 42 d (AVA₁₋₄₂), 5) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d, 0.45 kg/t from 22 to 35 d and 0.23 kg/t from 36 to 49 d (AVA₁₋₄₉). They were applied in a completely randomized design, involving a 2 × 5 factorial arrangement with 2 sex and 5 levels of inclusion, and 7 replications with 15 birds each. The supplementation with Ava Cid P showed no influence on males and females growth performance and goblet cell density ($P > 0.05$). However, it modified the gut morphometry, increasing jejunum villi height at 9 and 35 days ($P < 0.05$). The apparent villus surface area and villi height on birds fed with Ava Cid P during all phases also increased in relation to those who received only in the early phase. The expression of mucin 2 (MUC2) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) decreased on birds that received Ava Cid P at 21 days ($P < 0.05$), but no differences were seen for interleukin-1beta (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10). The results suggest that Ava Cid P can alter the mRNA expression of some inter-leukins, MUC2 and intestinal morphometry in broilers, increasing apparent villus surface area and villi height, which demonstrates the product potential as an alternative growth promoter.

Key words: Animal performance, Gut morphometry, Humic acid, Immunity, Poultry, Sodium butyrate.

¹Doctoral thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) March, 2017.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
Resumo	3
Abstract	4
Lista de Tabelas	7
Lista de Figuras	8
Lista de Abreviaturas e Símbolos	9
CAPÍTULO I	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Antimicrobianos promotores de crescimento	13
2.1.1 As restrições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento	15
2.2 Ácidos orgânicos	18
2.2.1 Ácido butírico.....	22
2.2.1.1 Ácido butírico e o sistema imune	25
2.3 Substância húmica	28
2.4 Estudos anteriores com a associação de ácido butírico e substância húmica na alimentação de monogástricos	31
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	33
3.1 Hipóteses	33
3.2 Objetivos	33
3.2.1 Geral.....	33
3.2.2 Específicos	33
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Considerações adicionais sobre manejo geral	35
CAPÍTULO II	36
MATERIALS AND METHODS	42
<i>Histological Analysis</i>	43
<i>MUC2 and Cytokines Expression</i>	44
<i>Statistical analysis</i>	45
RESULTS AND DISCUSSION	46
REFERENCES	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	74
Anexo A- Instrução aos autores para publicação na Revista Poultry Science	74

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1: Padrões de temperatura da cama de acordo com a idade das aves 35

Tabela 2: Programa de iluminação35

Capítulo II

Table 1: Profile of nutrients and energy of basal diet.....55

Table 2: Body weight, feed intake and feed conversion ratio of males and females in the experimental period56

Table 3: Goblet cell density of jejunum and ileum at 49 days of chickens fed Ava Cid P in different regimens.....357

Table 4: Effect of the treatments on the jejunum morphometric analysis at 9, 35 and 49d.....58

Table 5: Effect of the treatments on the ileum morphometric analysis at 9, 35 and 49d.....59

Table 6: Effect of the treatments on the cytokines and MUC2 expression.....60

Lista de Figuras

Figura 1: Respostas inflamatórias das aves perante o dano tecidual	15
Figura 2: Estrutura do ácido butírico (a) e estrutura do butirato de sódio (b) após a perda do H ⁺ do grupo –OH e ligação do Na.....	22
Figura 3: Absorção do butirato no intestino grosso e metabolismo subsequente... ..	23
Figura 4: Vista da House 6, local onde os frangos foram alojados.. ..	34
Figura 5: Vista dos boxes: comedouro tipo calha e bebedouro nippel.....	34

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AGCC: ácidos graxos voláteis de cadeia curta
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1: proteína ativadora 1
APC: antibiótico promotor de crescimento
COX-2: ciclooxigenase-2
DNA: ácido desoxirribonucleico
FAO: Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA: *Food and Drug Administration*
GALT: tecido linfóide associado ao intestino
GLP: peptídeos semelhantes ao glucagon
GPR: receptor de proteína acoplada G;
HCO₃⁻: bicarbonato
HDAC: histona deacetilase
HDP: peptídeos de defesa
HSP: *heat shock proteins*
IFN-γ: interferon-gama
IL: interleucina
LDL: lipoproteínas de baixa densidade
LOX: lipoxigenase
LPS: lipopolissacarídeos
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCT: transportadores de monocarboxilato
MeHg: metil-mercúrio
mRNA: RNA mensageiro; RNA: ácido ribonucleico
MUC: gene de mucina
NF-κB: fator nuclear κB
OAT7: ânion transportador orgânico 7
Oestr: sulfato de oestrone
OIE: Organização Mundial da Saúde Animal
OMS: Organização Mundial da Saúde
SMCT: transportador MCT acoplado ao Na
SOCS3: supressor de sinalização de citocina 3
SPI -1: *Salmonella pathogenicity island*
Th: linfócito T *helper*
TLR: receptores *toll-like*
USDA: *United States Department of Agriculture*
WHO: *World Health Organization*

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira destaca-se como uma atividade dinâmica, avançada tecnologicamente, competitiva e fortemente consolidada nos mercados interno e externo. A atividade absorve uma porcentagem expressiva da produção nacional de grãos, possibilita o desenvolvimento de novas regiões, o aumento da produção agrícola, a fixação do agricultor no campo e conseqüente geração de riquezas. Além disso, tem se destacado cada vez mais pela capacidade de alta e rápida produção de alimentos de excelente qualidade e baixo custo, permitindo à população de todas as rendas ter acesso à proteína animal, prova disso é o alto consumo nacional *per capita* da carne de frango que, em 2015, alcançou 43 kg (Associação Brasileira De Proteína Animal, 2016).

A carne de frango representa um dos principais produtos que compõem a balança econômica do país, sendo que em 2015 as exportações deste produto chegaram a 4,2 milhões de toneladas, gerando uma receita de 6,8 bilhões de dólares (Avisite, 2017).

Para produzir mais e de forma competitiva, há mais de 50 anos, os antimicrobianos promotores de crescimento vêm sendo utilizados na nutrição animal para aumentar a produtividade através do aumento na taxa de crescimento, redução da mortalidade e melhora da eficiência produtiva. Porém, a utilização dos antimicrobianos na alimentação animal tem sido tema de debates e discussões em razão da possibilidade da presença de resíduos de antimicrobianos e de seus metabólitos em produtos de origem animal, da possível seleção de bactérias resistentes e do aparecimento crescente de resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas.

Devido a estes riscos, os mercados importadores aumentaram suas exigências em relação aos produtos de origem animal, sendo que a União Europeia a partir de 2006 banuiu o uso dos antibióticos na alimentação animal; e o Brasil, como maior exportador mundial de carne de frango, deve adaptar-se às exigências dos mercados importadores.

Por estas razões, a indústria avícola tem buscado alternativas ao uso dos antimicrobianos, objetivando manter a mesma eficiência produtiva sem o risco de induzir resistência microbiana. Faz-se necessário continuar o desenvolvimento de novas tecnologias e pesquisas para possibilitar alternativas de substituição aos antibióticos promotores de crescimento, dando-se foco ao uso de combinações dos pró-nutrientes disponíveis, como os probióticos, prebióticos, leveduras e derivados de parede de leveduras, ácidos orgânicos, extratos vegetais e enzimas, que modificam de uma maneira menos agressiva a microbiota intestinal promovendo melhor equilíbrio de microrganismos na luz intestinal (MCCARTNEY, 2008).

Devido às lacunas ainda existentes acerca de quais produtos são realmente eficientes ao substituírem os antibióticos promotores de crescimento, este estudo objetivou testar o produto Ava Cid P¹ como aditivo alternativo, através da experimentação animal, usando frangos de corte como modelo. O

¹ Aditivo zootécnico composto por substância húmica de turfa de junco, butirato de sódio 30% protegido com óleo de palma e uma pequena porção de acidificantes (contendo ácidos cítrico, málico, fumárico e fosfórico). Nutriad, Inc. 201 Flannigan Road IL 60140, Hampshire, USA.

problema de pesquisa e as questões a serem respondidas são apresentados nesta tese através de um estudo bibliográfico, um artigo científico e conclusões.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antimicrobianos promotores de crescimento

O efeito de antibióticos como promotores de crescimento foi descoberto na década de 40, quando se observou melhora de crescimento em animais alimentados com micélios de *Streptomyces aureofaciens* contendo clortetraciclina (Stokstad et al., 1949; Stokstad e Jukes, 1950). A partir de então, os antibióticos vêm sendo utilizados como promotores de crescimento na avicultura.

Os antibióticos promotores de crescimento (APC) são definidos pela Organização Mundial de Saúde como agentes antibióticos utilizados com o propósito de aumentar o ganho de peso diário ou a eficiência alimentar em animais produtores de alimentos. Agente antibiótico é definido pelo mesmo órgão como toda substância de origem natural, sintética ou semissintética, que em baixas concentrações destrói ou inibe o crescimento de microrganismos, causando pequeno ou nenhum dano ao organismo hospedeiro (WHO, 2000).

O uso dos antibióticos é estritamente regulado por agências internacionais como a *Food and Drug Administration* (FDA), o *U.S. Department of Agriculture* (USDA) e o Parlamento Europeu e o Conselho Da União Europeia. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ao lado da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, vinculada ao Ministério da Saúde (ANVISA), regulamentam o uso terapêutico e não terapêutico de antimicrobianos em animais, seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) em questões relativas à segurança dos alimentos; mais especificamente, o MAPA segue as recomendações do *Codex Alimentarius* da FAO/OMS, do qual o Brasil é signatário (Palermo Neto, 2015).

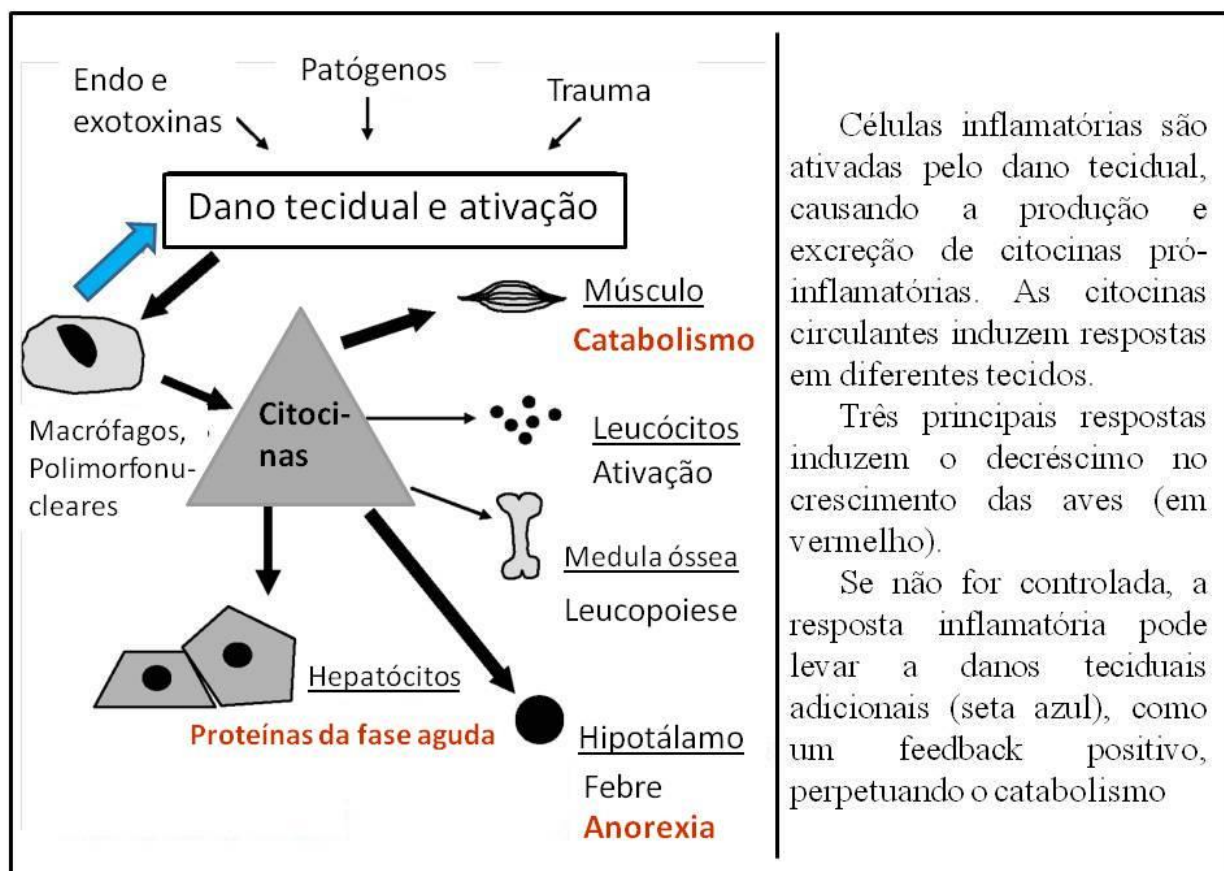
Albuquerque (2005) relata que a melhora no desempenho das aves é obtida por modificações nas bactérias que compõem a microbiota intestinal. A ação ideal de um aditivo ocorre sem que haja destruição total da microbiota bacteriana normal das aves, pois esta destruição reduziria a barreira protetora natural do trato intestinal, levando à proliferação de cepas patogênicas e aparecimento de infecções graves.

Segundo Santana et al. (2011), os antibióticos promotores de crescimento são utilizados para controlar ou equilibrar a proliferação de bactérias Gram-positivas que podem liberar metabólitos tóxicos que comprometem o ganho de peso, e que causam competição por nutrientes com o hospedeiro e estímulo excessivo do sistema imune local. Lillehoj e Lee (2012) relataram que a hipótese de ação antimicrobiana direta dos APC sobre a microbiota intestinal é suportada por observações que demonstraram maior crescimento de frangos criados em ambientes com desafios sanitários suplementados com APC e a falta deste efeito potencializador de crescimento em frangos criados em ambientes livres de patógenos ou extremamente limpos. Dibner e Richards (2005) relatam que o mecanismo de ação dos antibióticos promotores de crescimento é no intestino, já que alguns antibióticos não são absorvidos. Os efeitos diretos dos APC na microbiota são o

decréscimo da competição por nutrientes, redução dos metabólitos microbianos responsáveis por deprimir o crescimento das aves e redução da espessura da parede intestinal. Essa redução de espessura ocorre em parte pela redução na proliferação celular da mucosa, que ocorre na ausência de produtos derivados da fermentação microbiana, podendo a mesma explicar o aumento na digestibilidade dos nutrientes observada com o uso de APC.

Niewold (2007) relata que existem cinco mecanismos principais para explicar a ação dos APC:

- Inibição de infecções subclínicas e diminuição dos custos metabólicos do sistema imune;
- Redução de metabólitos produzidos pelos microrganismos, como amônia e produtos de degradação da bile, que levam à redução do crescimento das aves;
- Redução do uso de nutrientes pelos microrganismos;
- Os antibióticos promotores de crescimento se acumulam nas células inflamatórias: esta ação aumentaria a morte intracelular de bactérias e inibiria parte da resposta imune inata das aves (inibindo a ação de células fagocíticas e funções das células inflamatórias como quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio e produção de citocinas pró-inflamatórias). A redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias reduziria o estímulo catabólico e a consequente perda de apetite (Figura 1), melhorando o desempenho dos animais. Estas afirmações sobre este mecanismo de ação são corroboradas pelos trabalhos de Labro (1998, 2000);
- Melhora na absorção e utilização dos nutrientes pelos animais por tornar a parede intestinal mais fina. Como os antibióticos reduzem os níveis de inflamação intestinal, reduzem o acúmulo de células inflamatórias na mucosa, levando esta a ficar mais fina.



Células inflamatórias são ativadas pelo dano tecidual, causando a produção e excreção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas circulantes induzem respostas em diferentes tecidos.

Três principais respostas induzem o decréscimo no crescimento das aves (em vermelho).

Se não for controlada, a resposta inflamatória pode levar a danos teciduais adicionais (seta azul), como um feedback positivo, perpetuando o catabolismo

Figura 1– Respostas inflamatórias das aves perante o dano tecidual
Fonte: adaptado de Niewold (2007)

2.1.1 As restrições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação animal tem sido questionado em função do desenvolvimento de bactérias resistentes. Um dos primeiros relatos desta resistência na produção animal foi realizado por Elliott e Barnes (1959), que observaram resistência de microrganismos à tetraciclina em frangos de corte. Outros pesquisadores, como Collignon (1999), relataram a resistência de *Enterococcus spp.* associada ao uso de avoparcina como promotor de crescimento em animais de produção. No entanto, Cassenego et al. (2011) demonstraram que a suplementação de frangos de corte com diferentes promotores de crescimento, incluindo o antimicrobiano bacitracina metileno disalicilato, não teve efeito nos fenótipos e genótipos de resistência antimicrobiana de *Enterococcus sp.*

Segundo Kelley et al. (1998), numa população de bactérias, em um ambiente natural, aproximadamente 2% são resistentes a qualquer tipo de antibiótico. No entanto, em uma população bacteriana isolada de animais expostos regularmente ao uso de antibióticos, mais de 10% têm sido identificadas como resistentes. Estas bactérias resistentes são eliminadas nas

fezes, onde podem trocar plasmídeos extracromossomais resistentes a antibióticos (r-plasmídeos) com as bactérias nativas, que se disseminam para outros animais. *Salmonella spp.* e seus r-plasmídeos têm sido estudados nos resíduos de produção avícola, e têm se mostrado capazes de transmitir resistência para outras espécies, incluindo *E. coli*.

Casseneo et al. (2011) demonstraram fenótipos de resistência de *Enterococcus sp.* a vários antibióticos, incluindo alguns de uso humano como a estreptomicina, penicilina, ciprofloxacina, rifampicina e vancomicina. Os mesmos autores relatam a importância de outros fatores, que não o uso de promotores de crescimento, na propagação da resistência antimicrobiana, como a persistência de bactérias resistentes no ambiente, equipamentos, roedores e insetos e na própria ração ou ingredientes da ração animal.

Além disso, de acordo com Donoghue (2003) entre os consumidores há uma crença de que os produtos comestíveis oriundos das aves possuem altas concentrações de resíduos de medicamentos. Esta crença é reforçada pela mídia popular: a *American Airlines* publicou em sua revista (*AmericanWay*), distribuída em sua frota, um artigo de Gaskill (2002) recomendando a ingestão apenas de aves “orgânicas”, por causa dos hormônios e antibióticos utilizados nas produções industriais.

Devido a estas discussões sobre resistência bacteriana associada à produção animal, surgiram os regulamentos internacionais impedindo a importação (e produção) de produtos de origem animal em que se faz o uso de antibióticos promotores de crescimento.

Em 1997 a *World Health Organization* (WHO) e em 1998 a *Economic and Social Committee of the European Union* concluíram que o uso de antibióticos em animais destinados para a alimentação humana é questão de saúde pública. A primeira nação a eliminar o uso de antibióticos promotores foi a Suécia em 1986, mas ao entrar para a União Europeia em 1995, o uso foi autorizado até dezembro de 1998 (Castanon, 2007).

Em 1995 e 1996, Dinamarca e Alemanha proibiram o uso de avoparcina, argumentando que este antibiótico glicopeptídico produziria resistência aos antibióticos glicopeptídicos utilizados em humanos. Em 1998, Finlândia proibiu o uso de espiramicina e a Dinamarca o uso de virginamicina. Em 1998, o Regulamento 2821/1998 do conselho da União Europeia também banuiu o uso de bacitracina de zinco, já que era utilizada em tratamentos de pele em humanos (Castanon, 2007).

No Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2003, consta:

É pois necessário estabelecer uma data após a qual seja proibida a utilização de antibióticos ainda autorizados como *fatores* de crescimento, prevendo simultaneamente um período suficiente para o desenvolvimento de produtos alternativos para substituir esses antibióticos. Deverão tomar-se medidas para proibir a autorização de novos antibióticos para utilização como aditivos na alimentação animal (...) (Parlamento Europeu e o Conselho Da União Europeia, 2003)

Desde 2006 a União Europeia não usa e não importa produtos de origem animal em que foram utilizados determinados antimicrobianos, devido à preocupação com a transmissão e proliferação de bactérias resistentes através da cadeia alimentar (Brenes e Roura, 2010).

Nos Estados Unidos, recomendações para reduzir ou eliminar o uso de antibióticos na alimentação animal foram feitas em relatórios dos *Institute of Medicine* (1980, 1989), *Council for Agricultural Science and Technology* (1981), *World Health Organization* (1997) e *Committee on Drug Use in Food Animals* (1998). Em 2000, a WHO sugeriu que os APC que estão na mesma classe dos antibióticos utilizados em humanos sejam rapidamente retirados da produção animal. Também sugeriu que os antibióticos na produção animal sejam utilizados apenas de forma terapêutica e por prescrição.

Em 2015 a FDA lançou sua *final rule* da *Veterinary Feed Directive* (VFD) com o intuito de proibir o uso de medicamentos na alimentação animal sem a supervisão de um Médico Veterinário (Food and Drug Administration, 2015). Além disso, também em 2015 o Presidente Barack Obama lançou o Plano Nacional para combater bactérias resistentes a antibióticos, que, em uma de suas resoluções também exige que os produtores de animais necessitem de receitas de Médicos Veterinários para o uso de antibióticos importantes para a medicina humana, no tratamento de animais de consumo humano e prevê o fim do uso de medicamentos importantes para uso humano como promotores de crescimento até 2020 (White House, 2015).

Essas regulamentações e a pressão dos consumidores geraram fortes impactos em grandes redes alimentícias dos Estados Unidos. Segundo Sukhoterina (2015) uma pesquisa de mercado revelou que os restaurantes *Chipotle Mexican Grill* e *Panera Bread* possuem mais de 90% de suas refeições feitas com produtos livres de antibióticos, enquanto restaurantes como *Dunkin' Donuts* e *Mc Donald's* possuem políticas de restrição, sendo apenas utilizados produtos onde foi feito uso terapêutico de antibióticos e/ou de antibióticos não importantes para a medicina humana.

Baseado nas recomendações dos organismos internacionais de referência, o MAPA, por meio do DFIP/SDA, restringiu a autorização de diversos antimicrobianos com finalidade de aditivo melhorador de desempenho, considerando a avaliação de risco à saúde humana. Desta forma, já foram proibidos no Brasil, desde 1998, as substâncias antimicrobianas avoparcina, anfencóis, tetraciclina, penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, sulfonamidas, eritromicina, espiramicina e, mais recentemente, a colistina. O MAPA também está elaborando, conjuntamente com outros órgãos, como o Ministério da Saúde e a Anvisa, o Plano Nacional de Ação sobre Resistência aos Antimicrobianos. Este plano é um desdobramento do Plano de Ação Global sobre Resistência aos Antimicrobianos, aprovado em maio de 2015, no âmbito da OMS, dentro do conceito de "Saúde Única", com participação da FAO e OIE (Brasil, 2016).

2.2 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são moléculas formadas por um grupo carboxila, semelhante aos ácidos graxos, aminoácidos e outras substâncias orgânicas. Quando se fala em ácidos orgânicos trata-se de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGCC), chamados de “fracos”, que permanecem relativamente estáveis no trato gastrointestinal dos animais. Os ácidos fracos são potentes inibidores do transporte de aminoácidos por parte das células fúngicas, pela ionização interna no citoplasma e acidificação do conteúdo celular (Gonzales et al. 2005).

Após sua ingestão, os AGCC têm sua atividade antimicrobiana direta mais elevada no papo e moela das aves, que possuem uma capacidade limitada de modificar o pH da digesta (Dibner e Buttin, 2002). Segundo Adil et al. (2010) os AGCC têm tido uma grande contribuição na rentabilidade da produção de frangos, afetando de forma positiva a microbiota intestinal, a mucosa, o sistema imune, a digestão proteica, a secreção pancreática, a utilização de minerais e, por isso, a performance das aves.

Russel (1992) afirma que quando estão em sua forma não dissociada os AGCC penetram passivamente na célula microbiana, liberando prótons e ânions, o que resulta em redução do pH intracelular, inibindo a ação de enzimas e podendo levar o microrganismo à morte. Esta ação depende do acúmulo de ânions no conteúdo intracelular do microrganismo. De acordo com Dahiya et al. (2006), o princípio chave do modo de ação dos AGCC nos microrganismos é que os mesmos, em sua forma não dissociada (não ionizada, mais lipofílica), conseguem penetrar a parede celular destes microrganismos e alterar sua fisiologia. Nas bactérias, eles reduzem o pH interno, e como as bactérias não toleram grandes variações de pH entre o meio externo e interno, as obriga a gastarem energia e, eventualmente, pararem seu crescimento ou morrerem tentando trazer seu pH interno aos níveis normais.

A taxa de absorção dos AGCC depende de seus pKa (potencial de dissociação = $-\log K_a$) e do pH intestinal. Ácidos graxos de cadeia curta são rapidamente absorvidos quando o pH do lúmen está abaixo de seus pKa. Embora o pH do conteúdo de íleo, ceco e cólon (6,4 no duodeno, 6,6 no jejuno e 7,2 no íleo) estejam geralmente acima dos valores do pKa dos ácidos (o que os manteria quase que totalmente na sua forma ionizada e pouco absorvida), ocorre uma queda no valor do pH na superfície absorptiva devido à troca iônica (Na-H) exercida pelas células do epitélio, transformando-os na forma não-ionizada e absorvível, devido ao gradiente eletroquímico constante estabelecido entre o lúmen e a célula epitelial (Partanen e Mroz, 1999).

Outro mecanismo dos AGCC, tóxico para os microrganismos, é que eles interferem na estrutura e transporte elétrico da membrana citoplasmática, reduzindo a produção de ATP. A ação antimicrobiana se dá pela combinação da dissipação da força próton-motiva e inabilidade do microrganismo em manter o pH interno seguida pela desnaturação das proteínas sensíveis aos ácidos e do DNA (Ricke, 2003).

Dibner e Buttin (2002) relatam que os AGCC desempenham um papel importante na redução de microrganismos como *Escherichia coli*, *Campylobacter* e *Salmonella*. De acordo com os autores, a administração destes produtos na dieta resulta na melhora do *status* imunitário das aves, através da redução de infecções subclínicas, contribuindo com o aumento na absorção de nutrientes. Ainda, afirmam que estes ácidos aumentam a digestibilidade da proteína e energia pela redução da competição microbiana por nutrientes e das perdas endógenas de nitrogênio, reduzem o pH da digesta e aumentam a secreção pancreática.

Misturas de diferentes AGCC induzem mudanças na microbiota intestinal, tornando-a mais homogênea e aumentando a colonização ileal por lactobacilos em frangos de corte (Weber et al., 2012). Em experimento conduzido por Calaça (2009), com aves desafiadas com *Salmonella enteritidis* e *Eimeria tenella*, no qual se avaliou o efeito de uma mistura de AGCC (ácido acético 5%, fórmico 12% e propiônico 4%) adicionada à ração na concentração de 4 kg/t, foram encontradas melhorias do desempenho zootécnico e reflexos positivos no controle de *Salmonella enteritidis* e *Eimeria tenella*.

Os AGCC também apresentam efeito trófico sobre a mucosa intestinal, o que foi inicialmente descrito por Sakata e Engelhardt (1983). Tappenden et al. (1994) demonstraram que os AGCC são capazes de aumentar a expressão de pró-glucagon e genes de resposta rápida do sistema gastrointestinal (*c-myc*, *c-jun* e *c-foc*). Os peptídeos derivados do pró-glucagon estão fortemente relacionados com a proliferação celular intestinal, enquanto os genes de resposta rápida controlam a divisão, crescimento, diferenciação e apoptose.

A suplementação dos ácidos fórmico, fumárico, acético e cítrico em dietas de frangos de corte, em níveis de inclusão entre 0,25% e 3% é capaz de aumentar significativamente a altura de vilos no duodeno. O aumento na altura de vilosidades no intestino delgado de aves recebendo estes ácidos pode estar associado à redução do crescimento de bactérias patogênicas e não patogênicas no intestino que diminui os processos inflamatórios na mucosa, permitindo que as vilosidades exerçam adequadamente suas funções de secreção, digestão e absorção de nutrientes (Ghazalah et al., 2011).

Viola e Vieira (2007) avaliaram o efeito da suplementação de acidificantes (mistura de ácidos láctico, fórmico, cítrico, acético, ortofosfórico e benzóico) na dieta sobre o desempenho zootécnico e a morfologia intestinal de frangos de corte, através da comparação de aves que receberam antibióticos promotores de crescimento, acidificantes ou nenhum aditivo. Houve um benefício geral do uso de acidificantes sobre a conversão alimentar, na manutenção do desempenho e das condições morfológicas do intestino delgado das aves, respostas similares aos benefícios obtidos com o uso de antibióticos. Kum et al. (2010) trabalhando com inclusão de butirato, propionato, lactato e formiato de cálcio, observaram que a suplementação com AGCC aumentou significativamente a área de absorção intestinal, pela estimulação do crescimento, altura e largura dos vilos. Em paralelo, a contagem de células calciformes também foi mais alta nas aves suplementadas. Analisando o efeito dos ácidos fumárico e láctico na morfometria intestinal de frangos de corte, Adil et al. (2010) concluíram que

houve um crescimento da altura de vilosidades no jejuno, com a inclusão dos ácidos (inclusões de 2% e 3% para ambos), e no duodeno, com a inclusões de 3%.

O estudo realizado por García et al. (2007) demonstrou que a suplementação com ácido fórmico (0,5% e 1%) aumentou a altura de vilosidades e também a profundidade de criptas na suplementação de 1%. A profundidade de cripta é uma medida de proliferação celular, sendo que criptas menos profundas indicam uma menor atividade metabólica por uma menor destruição celular (Pereira et al., 2015; Viola e Vieira, 2007). Criptas mais profundas indicam maior renovação e *turn-over* celular, já que os vilos se originam da base das criptas (Maiorka et al., 2016).

Ghazalah et al. (2011), Khan e Iqbal (2016) afirmam que o aumento da altura das vilosidades pode ser atribuído ao papel do epitélio intestinal como uma barreira natural contra bactérias e suas substâncias tóxicas presentes no lúmen intestinal. Essas substâncias tóxicas causam distúrbios na microbiota normal e no epitélio intestinal, que altera sua permeabilidade, facilitando a invasão de patógenos, alterando o metabolismo (habilidade de digerir e absorver nutrientes), o que culmina em um processo inflamatório crônico na mucosa. O uso dos AGCC reduz o crescimento e colonização bacteriana, reduzindo os processos inflamatórios, levando a um aumento da altura de vilosidade, redução no *turn-over* celular e melhora das capacidades secretórias, digestivas e absorptivas.

Além da ação antimicrobiana e na qualidade intestinal, os AGCC também exercem efeito sobre a resposta imune e imunocompetência de frangos de corte. Aves alimentadas com rações contendo ácido acético, cítrico e láctico (1,5% a 3%) apresentam melhor resposta imune, indicada pelo aumento nas globulinas séricas, redução na razão albumina/globulina, e aumento do peso relativo de bursa e timo. O aumento do nível de globulinas, acompanhado da redução na razão albumina/globulina significa uma melhor resistência às doenças (Abdel-Fattah et al., 2008). Chowdhury et al. (2009) e Haque et al. (2010) relatam melhora do status imune das aves, detectada pela densidade de células imunocompetentes (linfócitos) na lâmina própria e submucosa das tonsilas cecais, íleo, e no córtex e medula dos folículos da Bursa, em frangos de corte suplementados com ácido cítrico à 0,5%. Houshmand et al. (2012) observaram aumento nos títulos de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, aos 21 dias, em aves suplementadas com AGCC (1,5%) em relação ao grupo controle.

A suplementação com uma combinação de ácido sórbico 1%, ácido cítrico 0,2% e probióticos é capaz de alterar a expressão de receptores *toll-like* (TLR)-2 e de citocinas. Estes suplementos reduzem a expressão cecal de TLR-2 e ileal de interleucina (IL)-12p35 e interferon-gama (IFN- γ) aos 11 dias, e aumentam o número de células calciformes no jejuno e íleo de frangos de corte. Possivelmente o efeito anti-inflamatório destes promotores alternativos se dá via rotas associadas ao linfócito T *helper* (Th)-2 e o aumento do número de células calciformes devido ao fornecimento de probióticos (Rodríguez-Lecompte et al., 2012). Os TLR são receptores de reconhecimento de patógenos, e fazem parte do sistema imune inato. Eles reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos e sinalizam para ativação de vários

fatores de transcrição, como o fator nuclear κB (NF- κB) e a proteína ativadora 1 (AP-1), que, por sua vez, ativam muitas moléculas necessárias às respostas inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial (Abbas et al., 2012). A redução na expressão de TLR-2 pelo uso de AGCC pode ser atribuída à sua ação antimicrobiana, limitando o crescimento e colonização da mucosa intestinal por bactérias patológicas e não patológicas, reduzindo assim, a resposta imune (Rodríguez-Lecompte et al., 2012).

De acordo com Lohakare et al. (2005) os AGCC são capazes de aumentar os linfócitos CD4 e TCR-II. Estas células participam da resposta imune a antígenos exógenos através do contato com células apresentadoras de antígenos. Essa apresentação estimula a síntese de IL-2, que por sua vez, ativa as células CD8, natural killers e linfócitos B. Portanto, o aumento de linfócitos CD4 e TCR-II pelos AGCC indica um aumento de linfócitos para antígenos externos e a preparação do organismo para uma resposta rápida.

Segundo Pereira et al. (2015) a suplementação com AGCC (ácidos acético, butírico e láctico), na primeira semana de vida, eleva o número de células CD3+, pelo aumento de bactérias ácido lácticas na mucosa intestinal causado por essa suplementação. Essas bactérias ácido lácticas estimulam as células T no intestino e, na ausência de injúrias, células de memória permanecem na mucosa ao longo da vida dos frangos, o que é extremamente importante para a manutenção da saúde intestinal.

Devido a estas propriedades dos AGCC, muitos trabalhos demonstram os benefícios de sua suplementação no desempenho zootécnico de frangos de corte (Antongiovanni et al., 2007; Hashemi et al., 2014; Al-Sultan et al., 2016). Porém, diversos trabalhos relatam ausência de qualquer efeito consistente na performance das aves (Hernández et al., 2006; Biggs e Parsons, 2008; Akyurek and Yel, 2011).

Adil et al. (2010) demonstraram melhora significativa no ganho de peso e conversão alimentar com o uso de 2% e 3% de ácido fumárico em frangos de corte criados em condições padrão. Já Campos et al. (2004), utilizando rações de alta e baixa energia, não encontraram melhoras no desempenho com uso de 0,3%, 0,4% e 0,5% de ácido fumárico. As inclusões de ácidos fórmico (0,25 a 1%), fumárico (0,5 a 1,5%), acético (0,25 a 0,75%) ou cítrico (1 a 3%) aumentou significativamente o peso corporal e o índice Europeu de Eficiência Produtiva de frangos de corte, além da conversão alimentar no caso dos ácidos acéticos e cítricos no trabalho realizado por Ghazalah et al. (2011); enquanto Biggs e Parsons (2008), trabalhando com a inclusão de ácidos fumárico (1,5% a 4,5%) e cítrico (3% e 4%) na dieta de pintos machos de poedeiras, não encontraram qualquer melhoria de desempenho, o que também foi observado com a inclusão de ácido málico (2% a 4%).

Pode-se atribuir estas divergências de resultados ao fato de que ainda não há um consenso sobre qual é a dose de inclusão correta destes ácidos. Também observa-se que muitos experimentos apresentam condições ideais às aves, enquanto outros apresentam desafios sanitários, nutricionais ou ambientais, o que interfere na ação melhoradora dos AGCC.

2.2.1 Ácido butírico

O ácido butírico ou 1-butanóico é um ácido graxo de cadeia curta, pertencente à classe dos ácidos carboxílicos, sendo composto de quatro cadeias de carbono. Seu carbono terminal forma um grupo carboxila (-COOH), o grupo funcional dos ácidos carboxílicos. O íon hidrogênio do grupo hidroxil (-OH) é fracamente ligado e facilmente substituído. Em solução, o ácido butírico perde este íon hidrogênio para formar o íon butirato ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$). O butirato de sódio é um sal do ácido butírico contendo um átomo de sódio (Na) no lugar deste hidrogênio do grupo -OH, como demonstra a Figura 2 (Ahsan et al. 2016).

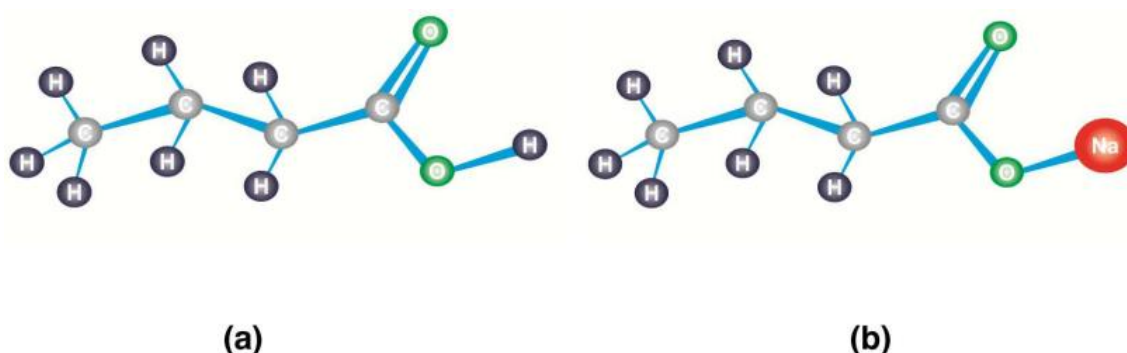


Figura 2 – Estrutura do ácido butírico (a) e estrutura do butirato de sódio (b) após a perda do H^+ do grupo -OH e ligação do Na
Fonte: Ahsan et al. (2016)

O butirato está naturalmente presente em altas concentrações no intestino grosso, e é a fonte preferencial de energia para os colonócitos. Polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos resistentes à ação das enzimas hidrolíticas na porção inicial do intestino, além de células provindas de descamação, muco e secreções endógenas chegam à região do ceco e cólon, onde sofrem fermentação bacteriana, levando à formação de grandes quantidades de butirato, que age como um receptor terminal de elétrons em um ambiente limitado em O_2 . No intestino grosso, os enterócitos utilizam primeiramente a glutamina e a glicose, enquanto os colonócitos têm o butirato como a principal fonte metabólica de energia (Guilloteau et al., 2010).

Quando fornecido por via oral, a eficácia do butirato de sódio depende do pH do meio em que se encontra no sistema digestivo. Em um meio com pH menor que o pKa do ácido butírico (pKa 4,82) a maioria das moléculas permanecem não dissociadas e por isso, o ácido será eficiente. O butirato de sódio é convertido a ácido butírico após a ingestão, sendo que o pH ácido do papo, proventrículo e moela permitem que o mesmo continue em sua forma não dissociada e ativo (Ahsan et al. 2016). Por isso, quando ingerido, o ácido butírico possui sua maior ação no trato digestivo superior, sendo quase totalmente absorvido no duodeno. No entanto se ingerido de forma protegida, sua ação pode avançar para as partes mais distais do intestino delgado e

grosso, pois sua liberação é lenta durante o seu transporte no trato gastrointestinal (Van Immerseel et al. 2004, Hu e Guo, 2007). Para torná-lo protegido, lipídeos e minerais são utilizados (Van Immerseel et al., 2005).

O butirato é absorvido no intestino delgado e intestino grosso, através de diferentes transportadores dependendo do local onde se encontra, podendo ser realizado por difusão não iônica (envolvendo trocas com o HCO_3^-) e por transportadores de monocarboxilato (MCT) (Ritzhaupt et al., 1998). O processo de absorção do butirato está representado na Figura 3.

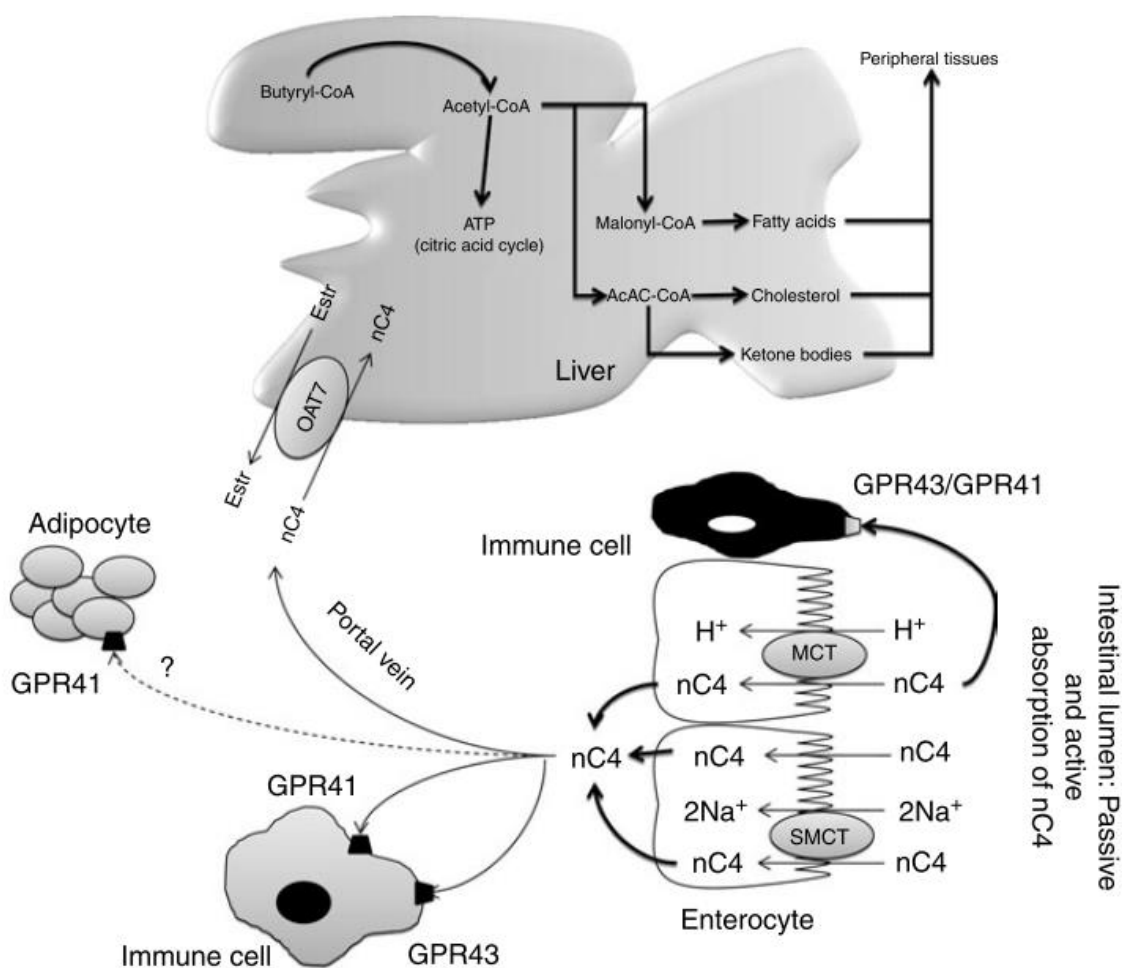


Figura 3 – Absorção do butirato no intestino grosso e metabolismo subsequente. O transporte do butirato através do MCT é saturável e acoplado ao H^+ . Receptores para butirato são identificados em diversos tecidos, incluindo o tecido adiposo e células imunes. Após o intestino, o butirato pode ser metabolizado no fígado para produzir ácidos graxos, colesterol e corpos cetônicos. Oestr: sulfato de oestrone; OAT7: ânion transportador orgânico 7; GPR: receptor de proteína acoplada G; SMCT: transportador MCT acoplado ao Na.

Fonte: Guilloteau et al., 2010.

Os colonócitos exibem uma grande capacidade de metabolizar rapidamente o butirato. Através da oxidação de ácidos graxos o butirato é oxidado a CO₂ ou utilizado para a síntese lipídica. O butirato também é capaz de aumentar a lipogênese pela acetil-CoA ou síntese de corpos cetônicos. Por isso a síntese de muitos componentes do epitélio intestinal depende do metabolismo deste ácido orgânico (Guilloteau et al., 2010).

De acordo com Mroz et al. (2006) o ácido butírico é reconhecido como a mais importante fonte respiratória e de energia para a proliferação das células do epitélio intestinal, e está diretamente e indiretamente envolvido em vários mecanismos regulatórios da diferenciação, crescimento, permeabilidade e expressão gênica celular. Shira et al. (2005) e Panda et al. (2009) relatam que a suplementação com butirato é muito mais eficiente nas primeiras semanas de vida das aves, na ausência da proteção dos antibióticos, porque neste momento, o intestino e o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) estão em processos de desenvolvimento e maturação. Segundo Van Der Wielen et al. (2000), em pintos de corte de 0-4 dias de idade, *Enterobacteriaceae* e enterococos são dominantes no ceco, cujas frequências vão diminuindo com o crescimento das aves. Os autores conduziram uma pesquisa com a finalidade de confirmar a relação existente entre ácidos graxos voláteis (ácidos acético, láctico, propiônico e butírico) e o estabelecimento da microbiota cecal em pintos de corte. O estudo demonstrou que ácidos graxos voláteis não dissociados são responsáveis pela redução in vivo do número de *Enterobacteriaceae* (incluindo *Salmonella* sp.) no ceco de pintos de corte, indicando um efeito bacteriostático destes ácidos.

Segundo Guilloteau et al. (2010), em estudos sobre proliferação, dano celular e morte programada, foi revelado que o butirato aumenta a velocidade de maturação (no desenvolvimento) e reparo após dano, sendo um dos mecanismos o aumento do índice mitótico no intestino delgado. Além disso, ele aumenta a atividade secretória das células caliciformes secretoras de fator de crescimento epitelial no intestino grosso e estimula a liberação de peptídeos gastrointestinais.

Muitos autores têm demonstrado a influência do ácido butírico na morfometria intestinal de frangos de corte (Antongiovanni et al., 2007; Panda et al., 2009; Jiang et al., 2015). Em aves submetidas ao estresse por calor, ocorre uma redução do peso corporal, ganho de peso, altura de vilosidades, área de superfície dos vilos e peso do intestino, no entanto a suplementação de ácido butírico consegue contrabalancear estas perdas. Além disso, após o período de estresse, o ácido butírico também aumenta a recuperação destas medidas em relação às aves não suplementadas (Abdelqader e Al-Fataftah, 2016).

Adil et al. (2010), Chamba et al. (2014) e Awaad et al. (2016) também encontraram influências da suplementação de ácido butírico na morfometria intestinal de frangos de corte, observando aumento da altura de vilosidades nas aves suplementadas. Jerzsele et al. (2012) trabalhando com aves previamente infectadas com *C. perfringens* e imunossuprimidas com vacina de Gumboro via água, observaram aumento na altura de vilosidades das aves tratadas com butirato de sódio 1,5 kg/kg e aumento de altura de vilos e da razão altura de vilo/profundidade de cripta nas aves suplementadas com butirato de sódio e óleos essenciais. No entanto, Hu e Guo (2007) e

Smulikowska et al. (2009) relatam que, em geral, em situações convencionais de criação e em lotes de frangos de corte sadios, os benefícios da suplementação com butirato de sódio, ao epitélio do intestino delgado, são, em geral, insignificantes.

Como mencionado no subtítulo anterior, quando ocorrem modificações na morfometria do intestino delgado pelo uso do butirato, as mesmas também podem ser atribuídas à redução do crescimento de bactérias patogênicas e não patogênicas no trato gastrointestinal, o que reduz a colonização, os processos inflamatórios da mucosa, permitindo um aumento da altura das vilosidades e de suas funções metabólicas de secreção, digestão e absorção de nutrientes.

O aumento na concentração de ácido butírico, resultante da fermentação bacteriana, reduz o pH luminal na região próxima ao cólon. Este pH mais baixo parece impulsionar ainda mais a produção de butirato, uma vez que um pH ligeiramente ácido permite que as bactérias produtoras de butirato compitam com bactérias Gram-negativas utilizadoras de carboidratos, como *Bacteroides* spp. (Walker et al., 2005).

Van Immerseel et al. (2004) relatam a redução da presença de *Salmonella* no intestino de frangos de corte com a suplementação de ácido butírico protegido. De acordo com estes autores, a ação deste ácido ocorre, em parte, pela modulação da expressão gênica deste microrganismo, diminuindo a expressão do gene *Salmonella pathogenicity island* (SPI) -1, que está envolvido na invasão do epitélio intestinal. Fernández-Rubio et al. (2009), comparando o butirato de sódio não protegido e parcialmente protegido, também comprovaram sua eficácia contra *S. enteritidis*. A forma parcialmente protegida foi mais efetiva nas fases tardias da infecção, permanecendo ativo ao longo de todo o trato gastrointestinal. Segundo Panda et al. (2009) a suplementação de frangos de corte com 4 e 6 g/kg de butirato não protegido, tem efeito similar ao uso de 0,5 g/kg de furazolidona na redução da contagem de *Escherichia coli* no papo e intestino delgado. Além disso, a suplementação de frangos com 2 g/kg de butirato não protegido, de 1 – 21 dias, reduziu significativamente a contagem de *Lactobacillus* spp. no jejuno (Hu e Guo, 2007). No entanto, a suplementação com 3 g/kg de butirato protegido não resultou em mudanças significativas no número total de *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. no íleo e ceco (Czerwinski et al., 2012). Timbermont et al. (2010) demonstraram que, na inclusão de 0,3 g/kg (fase inicial) e 0,2 g/kg (crescimento) o ácido butírico foi capaz de reduzir o número de aves com lesões por enterite necrótica após desafio oral com *C. perfringens*.

2.2.1.1 Ácido butírico e o sistema imune

O sistema imune inato, que é mediado pelos macrófagos, heterófilos e linfócitos B1 produtores de anticorpos naturais², é bastante efetivo na defesa contra a maior parte dos patógenos. O custo metabólico do desenvolvimento

² Anticorpos naturais são anticorpos com especificidade limitada, que já estão presentes antes da infecção e que reconhecem padrões moleculares comuns em microorganismos ou células estressadas ou mortas. Reconhecem moléculas de carboidrato ou lipídio, mas não proteínas, e são isotipos de IgM em sua maioria (Abbas et al., 2012).

do sistema imune inato é baixo, porém, os custos do seu uso são altos. Já o sistema imune adaptativo, mediado por linfócitos B2 e T é ineficiente no primeiro contato com o patógeno, tem alto custo de desenvolvimento e baixo custo de uso subsequente (Klasing, 2007). As perdas de performance em uma resposta hiperinflamatória ocorrem não só pelo custo metabólico das células imunes, mas também pela anorexia, caquexia e degradação tecidual causada pela resposta (Koutsos e Klasing, 2014). Klasing e Leshchinsky (1999) afirmam que 70% da redução do crescimento animal se deve à redução do consumo durante o estresse imunológico, sendo o acréscimo de músculo esquelético mais afetado do que os demais órgãos e sistemas.

De acordo com Rubin et al. (2007a) as perdas de desempenho devido ao estresse imunológico ficam evidentes quando da aplicação de vacinas no início da vida das aves, sendo que no experimento conduzido pelos autores, a vacinação causou redução do peso corporal, consumo alimentar e piorou a conversão alimentar aos 21 dias, o que não se perpetuou até os 42 d. Uma hipótese para explicar estes resultados seria que as vacinas, aplicadas no início da vida das aves, diminuem o consumo alimentar e a eficiência de absorção e metabolismo dos nutrientes, devido aos diversos eventos metabólicos envolvidos no estresse imunológico, como a redistribuição de cátions bivalentes, alto gasto energético, alta degradação do músculo esquelético, maior oxidação de aminoácidos e alta glicogênese mediada por aminoácidos (Rubin et al., 2007a; Rubin et al., 2007b).

As citocinas são proteínas que regulam e coordenam muitas das atividades celulares do sistema imune inato. São produzidas por diferentes células, incluindo células dendríticas, macrófagos e mastócitos, sendo que as mesmas conduzem o processo inflamatório e/ou contribuem para a defesa contra infecções virais (Abbas et al., 2012). Citocinas pró-inflamatórias produzidas após a estimulação imune, como é o caso da IL-1, são capazes de reduzir a taxa de ganho e o consumo alimentar de aves expostas à inoculação de lipopolissacarídeos de *E. coli* (LPS). Além disso, a inoculação de IL-1 aumenta a degradação e reduz a síntese do músculo esquelético (Cook et al., 1993).

O ácido butírico e seus sais são capazes de reduzir a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias via inibição do fator nuclear Kappa B (NF- κ B). O NF- κ B é um fator de transcrição que regula a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, enzimas que participam da inflamação, moléculas de adesão, fatores de crescimento, algumas proteínas de fase aguda e receptores imunes. Desta forma, este fator pode influenciar toda a resposta imune inata (Jobin e Sartor 2000; Segain et al., 2000; Lührs et al., 2001; Song et al., 2006).

Zhang et al. (2011) ao testarem os efeitos do butirato de sódio no desempenho zootécnico e resposta imune de frangos de corte, demonstraram que quando o mesmo é adicionado à dieta há uma inibição significativa da elevação dos níveis de IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α nas aves desafiadas com LPS e também nas aves não desafiadas, apesar de não encontrarem diferenças significativas no desempenho. Jiang et al. (2005) também encontraram redução no TNF- α e também no NF- κ B em aves desafiadas com LPS e suplementadas com butirato de sódio. In vitro, Zhou et

al. (2014) demonstraram que o butirato reduziu a expressão de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-10 em macrófagos de galinhas estimulados com LPS; porém, na ausência de LPS, não foram observados efeitos significativos na expressão de mRNA de citocinas inflamatórias.

In vitro, o butirato é capaz de inibir a indução da síntese de DNA de linfócitos em ratos (Kyner et al., 1976), sendo também relatado que o mesmo age como um fator de anergia das células Th 1, pois bloqueia o ciclo de ativação destas células na fase G1 (Jackson et al., 2002). O butirato também é capaz de modificar a resposta inflamatória inibindo a expressão gênica de certas HSP (*heat shock proteins*) e aumentando a expressão de mRNA de LOX, que induz a diferenciação celular e controla a permeabilidade celular, e de peptídeos semelhantes a glucagon (GLP) – 1 e 2, que diminuem a secreção e motilidade gástrica, aumentam a circulação sanguínea no intestino, a proliferação celular e reduzem a apoptose celular na cripta (Guilloteau et al., 2010). Sunkara et al. (2012) demonstraram que o butirato é um potente indutor da expressão gênica de peptídeos de defesa (HDP) em macrófagos de frangos, sendo que essa indução ocorre independentemente do estímulo da expressão de IL-1 β . Em nível intestinal, o butirato também modula a expressão de genes associados ao estresse oxidativo, como os da catalase, superóxido dismutase (entre outros) com o intuito de reduzir o dano oxidativo (Guilloteau et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Também fazem parte da resposta imune inata as mucinas, que são proteínas extensamente glicosiladas que formam uma barreira física viscosa, que impede o contato entre os microrganismos e as células do trato gastrointestinal. Possuem diferentes oligossacarídeos e podem formar glicoproteínas de superfície celular e secretadas. As mucinas secretadas (MUC2, MUC5 e MUC6) formam um gel hidratado (de 300 a 700 μ m) que protege as células epiteliais de revestimento do contato com microrganismos e serve também como matriz para exposição de substâncias antimicrobianas produzidas pelas células epiteliais. Além do muco secretado, a superfície apical das células epiteliais gastrointestinais é coberta com mucinas ligadas à membrana, sendo elas: MUC1, MUC3A/b, MUC12, MUC13 e MUC17. Essas mucinas ligadas à membrana combinam-se com glicolipídeos e formam uma camada macromolecular densa (30 a 500 nm) na superfície do epitélio, chamada glicocálice (Abbas et al., 2012).

Tem sido proposto que os AGCC, em especial o ácido butírico, reforçam a barreira de defesa intestinal pelo aumento da produção de mucina e peptídeos antimicrobianos. De acordo com Willemsen et al. (2003) os AGCC são capazes de aumentar a razão prostaglandina E1/E2 secretada pelos miofibroblastos subepiteliais no intestino, o que, por sua vez, aumenta a expressão epitelial de mucina (MUC). No entanto, Gaudier et al. (2004), que descrevem a ação de modulação do butirato na expressão gênica de MUC em células caliciformes do cólon em humanos, relatam que esta modulação varia de acordo com o tipo de gene de MUC. É uma modulação fortemente dependente da fonte de energia provida às células e, em meios de cultura padrão (sem privação de glicose), o butirato aumenta a expressão de MUC3 e MUC5B, mas não de MUC2. Estes mesmos autores sugerem que os

mecanismos de regulação da expressão de MUC3 ocorre via inibição da histona deacetilase (HDAC).

2.3 Substância húmica

A turfa é um material natural, facilmente disponível e fonte de substâncias biológicas ativas bastante usadas não só na agricultura, mas também na medicina e veterinária. É vista como um agente terapêutico contra gastrite e problemas digestivos como hiperacidez, diarreia, úlceras gástricas e disenteria. Recentemente, o interesse do uso da turfa como aditivo alimentar animal vem crescendo, em função de suas ações de estimulação do crescimento e melhora do sistema imune, por conter grandes quantidades de substância húmica e outras substâncias orgânicas e minerais (Trckova et al., 2005).

As substâncias húmicas, formadas por matéria vegetal decomposta pela ação de bactérias vivas do solo, são compostas por húmus, ácidos húmico, fúlvico e ulmico e por microminerais, necessários para o desenvolvimento das plantas (Kocabağlı et al., 2002). São capazes de se combinar com íons metálicos, óxidos e argilas minerais, formando complexos solúveis e insolúveis em água, que podem interagir com compostos orgânicos como alcenos, ácidos graxos, substâncias ativas capilares e pesticidas (Islam et al., 2005).

Os humatos são estruturas complexas, que utilizam ligações de hidrocarbono para criar cadeias formadoras de novas moléculas. São compostos pela união de cargas negativas advindas do ácido húmico e positivas dos cátions sódio, potássio, magnésio, alumínio e ferro, que estão presentes no solo, formando pontes organominerais que ligam mecanicamente partículas do solo a uma estrutura que sustenta a vida dos microrganismos (Kucukersan et al., 2005).

Segundo Kucukersan et al. (2005) a utilização do ácido húmico na alimentação animal traz vantagens para a saúde e desempenho tais como:

- O ácido húmico, devido à sua estrutura macro coloidal de efeito adstringente, é capaz de formar um filme protetor na mucosa estomacal e intestinal, protegendo o trato gastrointestinal de infecções e toxinas;
- O ácido húmico é capaz de influenciar o metabolismo de proteínas e carboidratos, por sua ação no catabolismo microbiano;
- Suas aplicações orais, cutâneas ou subcutâneas inibem a inflamação;
- Assim como o ácido húmico retira toxinas relacionadas à adubação química, acumuladas no solo, quando adicionado na dieta, é capaz de adsorver e facilitar a excreção metais pesados, nitratos, fluoreto, organofosfatos, carbaril e inseticidas orgânicos contendo cloreto;

- O ácido húmico é capaz de estimular receptores do sistema imune no revestimento intestinal, influenciando a proteção contra patógenos.

Çeliak et al. (2008) demonstraram que a suplementação de frangos com 0,25% de ácido húmico aumentou o peso corporal, ganho de peso e o consumo alimentar, sendo que a sua inclusão associada a *Saccharomyces cerevisiae* também melhorou a conversão alimentar. De acordo com os autores o ácido húmico associado ao probiótico, estabiliza a flora intestinal, melhorando a utilização de nutrientes da dieta animal, aumentando o peso vivo sem alterar o consumo e, por isso, melhorando a conversão alimentar. Além disso o ácido húmico melhora a digestão proteica assim como a utilização de cálcio e microminerais.

No estudo realizado por Nagarj et al. (2014) foi observado que quanto maior o nível de inclusão de ácido húmico na dieta (níveis variando entre 0,5 e 1%) melhores foram os resultados de metabolizabilidade de matéria seca e da proteína bruta em relação às aves sem suplementação, o que pode ser atribuído à melhoria na utilização dos nutrientes, incluindo minerais. Além disso, os mesmos autores relatam que a receita líquida advinda do uso da suplementação com ácido húmico, apesar de não ter apresentado diferenças significativas, é superior aos grupos de aves não suplementadas ou suplementadas com antibióticos, já que o ácido húmico tem menor custo, demonstrando a viabilidade econômica do produto em dietas de frangos de corte.

A suplementação com ácido húmico é capaz de melhorar o desempenho de frangos de corte, aumentando o ganho de peso, reduzindo o consumo e melhorando a conversão alimentar (Kocabagli et al., 2002; Ozturk et al., 2010; Šamudovská e Demeterová, 2010; Ozturk et al., 2012; Arif et al., 2016) o que pode ser atribuído, em partes, a um aumento da massa de células epiteliais intestinais, levando a um melhor aproveitamento da dieta consumida (Arif et al., 2016). Além disso, essa suplementação reduz os níveis de colesterol total e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Ozturk et al., 2012; Arif et al., 2016), o que pode ser explicado pela ação do ácido húmico nos microrganismos: pela inibição de enzimas microbianas ele força a membrana celular bacteriana a utilizar energia para a liberação de prótons ácidos, para reduzir o pH intracelular (Arif et al., 2016).

Cálcio e fósforo têm importantes funções na estrutura e metabolismo ósseo e a suplementação com 1,5 g/kg de ácido húmico na dieta de frangos de corte aumenta a concentração de fósforo no plasma, o que é bastante significativo para a fisiologia das aves, principalmente em dietas com limitação deste elemento (Ozturk et al., 2012). Šamudovská e Demeterová (2010) demonstraram um aumento na concentração sérica de cálcio em aves suplementadas com ácido húmico aos 14 dias, apesar de muitos trabalhos relatarem o inverso, devido ao efeito quelante deste aditivo (Rath et al., 2006).

Quando adicionado na água de bebida (25,5 mg/kg de peso vivo), o ácido húmico é capaz de reduzir a contagem de bactérias aeróbicas mesófilas, M17 lactococci, coliformes e *E. coli* cecais (Ozturk et al., 2007). Aksu e Bozkurt (2009) relatam que frangos com dietas suplementadas com ácido húmico (1500

ppm) apresentam redução nas unidades formadoras de colônia de *E. coli* na digesta. Observaram também um aumento de *Lactobacilli* na digesta das aves suplementadas com ácido húmico, em relação às que receberam antibiótico. Além disso, certas formas modificadas de ácido húmico têm mostrado atividades antivirais, como por exemplo contra herpes *simplex* em humanos (Klocking et al., 2002).

Zralý et al. (2008) trabalhando com aves suplementadas com ácido húmico e com metil-mercúrio (MeHg), detectaram que após 10 dias de suplementação com MeHg, houve um aumento significativo das concentrações teciduais de Hg no fígado, rins, cérebro e músculo. A inclusão de 0,5 g de ácido húmico reduziu este aumento de concentração em todos os tecidos estudados, reduzindo também, os efeitos adversos do Hg no desempenho das aves, demonstrando sua ação como antagonista da absorção e dos efeitos tóxicos do metil-mercúrio.

Vêm sendo relatadas alterações na resposta imune causadas pelo ácido húmico. Riede et al. (1991) relatam que as substâncias húmicas são capazes de estimular certas funções nos neutrófilos, como a explosão respiratória, que leva à produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente H_2O_2 . Rath et al. (2006) demonstraram redução na contagem de neutrófilos e na razão neutrófilo:linfócito de frangos de corte, com 4 semanas, pela suplementação de ácido húmico. De acordo com os autores, tem sido proposto que o ácido húmico é capaz de causar uma marginação não específica de neutrófilos, levando à diminuição dos níveis sanguíneos. Além disso, estes autores também verificaram que a suplementação causou um aumento relativo do peso da Bursa de Fabricius, indicando um possível efeito imunoestimulante deste ácido.

Segundo Sanmiguel et al. (2016) a natureza estressante do período de muda afeta negativamente a resposta imune de aves de postura, aumentando os níveis plasmáticos de corticoides, reduzindo a efetividade do sistema imune, as respostas humorais e celulares e o número total de leucócitos. As substâncias húmicas exercem uma ação imunoestimulatória, quando suplementadas em poedeiras no período de pós muda: há um aumento do índice de fagocitose e de explosão respiratória aos 30 e 60 dias pós muda e uma melhoria nas atividades bactericida e de lisozimas nos 8 dias; além de um aumento na aglutinação bacteriana em todo o período experimental.

Nos estudos conduzidos por Hasan et al. (2009) e Hasan et al. (2010), com aves recebendo dietas contaminadas com aflatoxina e suplementadas com glucomanos, bentonite de sódio e ácido húmico, foi demonstrada uma redução significativa nos títulos de anticorpos contra Newcastle, Doença de Gumboro e Bronquite infecciosa pela ação da aflatoxina. Os suplementos melhoraram significativamente este efeito adverso, sendo que o ácido húmico foi o mais eficaz na melhoria da resposta imune humoral contra Bronquite infecciosa e Newcastle.

Corroborando as melhorias de resposta imune humoral, o trabalho de Nagarj et al. (2014) demonstrou que dez dias após vacinação, houve um aumento, embora não significativo estatisticamente, nos títulos de anticorpos contra Newcastle com a suplementação de ácido húmico, e houve aumento significativo nos títulos contra Doença de Gumboro. Os títulos para doença de

Gumboro foram inclusive maiores nas aves suplementadas com ácido húmico do que nas aves que receberam antibiótico.

Apesar de vários estudos demonstrarem a ação das substâncias húmicas na estimulação do sistema imune, Chien et al. (2015) demonstraram que o ácido fúlvico, contido nestas substâncias, é capaz de inibir a expressão de homocisteína e do mediador pró-inflamatório ciclooxigenase-2 (COX-2) nos monócitos, pela inibição da atividade de ligação do NF- κ B. Rensburg (2015) menciona que a atividade anti-inflamatória do humato leva a uma inibição da degranulação de fagócitos, da liberação de citocinas, de moléculas de adesão, do NF- κ B, de componentes do sistema complemento e oxidantes.

De acordo com Trckova et al. (2005) as substâncias húmicas presentes nas turfas são capazes de melhorar a resposta imune e o mecanismo de ação dessa melhoria pode estar associado à sua capacidade de formar complexos de sacarídeos que agem modulando as interações intercelulares. Estes complexos são capazes de manter o balanceamento da atividade imune e prevenir potenciais respostas inadequadas, que podem produzir sérios danos ao organismo, incluindo doenças autoimunes.

2.4 Estudos anteriores com a associação de ácido butírico e substância húmica na alimentação de monogástricos

No trabalho conduzido por Edmonds et al. (2014) foram avaliados os efeitos da inclusão de ácido húmico e ácido butírico protegido na dieta, individualmente e em combinação, na performance de frangos de corte. Para isso foram realizados 4 experimentos conduzidos em diferentes estações do ano, com inclusões de ácido butírico variando de 0,15 g/kg a 0,91 g/kg e de ácido húmico entre 0,91 e 4,53 g/kg. Nos experimentos conduzidos no início e final do verão, utilizando os dois suplementos associados ou individualmente, observou-se que a inclusão de ácido butírico e a associação do mesmo com ácido húmico melhorou o desempenho (ganho de peso, consumo e conversão alimentar) e a viabilidade criatória. Conclui-se então que em situações de possível estresse por calor, a suplementação com ácido butírico e ácido húmico melhora o crescimento e a eficiência alimentar, com redução na mortalidade de frangos de corte.

Analisando o desempenho e resposta inflamatória ao desafio com LPS em leitões desmamados suplementados com ácido húmico e ácido butírico protegido na dieta, Weber et al. (2014) verificaram que a inclusão dos aditivos, individualmente ou em associação, não alterou o desempenho dos animais não desafiados. O desafio com LPS, como esperado, desencadeou respostas pró-inflamatórias: aumento da temperatura corporal, aumento dos níveis de IL-1 β , de antagonista do receptor IL-1, IL-6 e do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3) no fígado; aumento da concentração sérica de cortisol e IL-6 e redução dos níveis de glicose e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). Perante o desafio com LPS, a combinação de ácido húmico e ácido butírico reduziu em 62% a concentração sérica de cortisol e aumentou em 59% a concentração sérica de IGF-1. O teste demonstrou que a

suplementação com estes aditivos modula diferentes aspectos da resposta imune ao LPS.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

- A suplementação de dietas de frango de corte com Ava Cid P melhora o desempenho de aves no período de 1 a 49 dias de idade.
- O Ava Cid P melhora a qualidade intestinal das aves
- O Ava Cid P causa alterações na resposta imune das aves
- O Ava Cid P serve como aditivo alternativo ao antibiótico promotor de crescimento, em dietas de frangos de corte.

3.2 Objetivos

3.2.1 Geral

Estudar o efeito de diferentes programas de suplementação do produto Ava Cid P, nas diferentes idades, no desempenho zootécnico, resposta imune e qualidade intestinal de frangos de corte.

3.2.2 Específicos

- Verificar a eficiência do Ava Cid P, quando utilizados em rações à base de milho e farelo de soja, na melhoria do desempenho zootécnico de frangos de corte;
- Analisar a ação do Ava Cid P na resposta imune inata das aves, através da medida dos níveis intestinais de IL-1 β , IL-10, TNF- α e MUC2.
- Analisar a ação do Ava Cid P na qualidade intestinal através da análise de morfometria intestinal e contagem de células calciformes.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de testar os efeitos do produto Ava Cid P (composto por substância húmica, butirato de sódio 30% protegido e uma pequena porção de acidificantes) suplementado na dieta, na performance, resposta imune e saúde intestinal de frangos de corte foi conduzido um experimento na Piedmont Research Station, pertencente ao North Carolina Department of Agriculture & Consumer Services, localizada em Salisbury, NC.

Foram utilizados 70 boxes telados, equipados com bebedouro nippel e comedouro tipo calha (Figura 4 e 5). Foram alojados 1080 pintos Ross 344 x 708 (540 fêmeas e 540 machos) separados por sexo (15 aves/box), e testados de 1 até 49 dias de idade. Algumas considerações complementares a respeito da metodologia serão aqui descritas, as demais e os resultados obtidos estão descritos no Capítulo 2 desta tese.

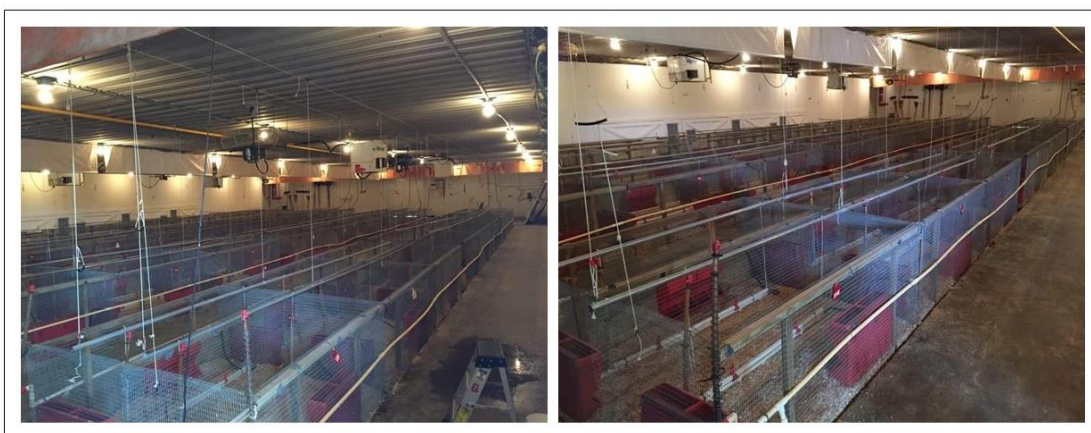


Figura 4 – Vista da House 6, local onde os frangos foram alojados. A sala era totalmente fechada, com temperatura regulada com ar-condicionados e caldeiras no teto.



Figura 5 - Vista dos boxes: comedouro tipo calha e bebedouro nippel. Detalhe da maravalha nova utilizada no alojamento.

4.1 Considerações adicionais sobre manejo geral

Os pintos, ao primeiro dia de idade, foram separados por sexo, pesados e distribuídos de acordo com o peso médio das aves. A temperatura da sala foi mantida de acordo com o padrão apresentado na Tabela 1.

Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. O programa de iluminação utilizado está demonstrado na Tabela 2.

Tabela 1 - Padrões de temperatura da cama de acordo com a idade das aves

Dia/ idade do lote	Temperatura medida na cama (°C)
1	35-36
2	31,1-32,2
3	30,5-31,7
4	30,0-31,1
5	29,4-30,5
6	28,9-30,0
7	28,8
8-14	28,3
15-21	26,7
22 - 49	23,9

Aos 21, 35, 42 e 49 dias de idade as aves foram pesadas para a determinação do peso. Nestas mesmas datas, a quantidade de ração fornecida e sobras de ração foram registradas para o cálculo de consumo alimentar e conversão alimentar por fase.

Tabela 2 - Programa de iluminação durante as 24 horas, de 1 a 49 dias

Idade do lote (dias)	Horas de luz	Horas de escuro
1-4	23h	1h
5-10	21h	3h
11-21	18h	6h
21-49	Luz natural	Luz natural

CAPÍTULO II

ORGANIC ACIDS AND HUMIC SUBSTANCE IN BROILER DIETS

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas para publicação no Periódico **Poultry Science**.

ORGANIC ACIDS AND HUMIC SUBSTANCE IN BROILER DIETS

Effect of different dietary supplementation programs of a product consisted of organic acids and humic substance on performance, immune response and gut morphology of broiler chickens

P. C. Aristimunha^{*}, R. D. Malheiros[†], P. R. Ferket[†], A. L. B. Moreira Filho[‡], E. T. Santos[§], D. T. Cavalcante[‡], A. M. L. Ribeiro^{*}

* Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; † Prestage Poultry Science Department, NC State University, Raleigh, NC, USA; ‡ Department of Animal Science, Center of Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba, Areia, PB, Brazil and §São Paulo State University, Faculty of Agrarian and Veterinary Science, College of Jaboticabal, SP, Brazil.

Corresponding author:

Andrea Machado Leal Ribeiro
Laboratório de Ensino Zootécnico
Avenida Bento Gonçalves 7712, Porto Alegre, RS, Brasil.
CEP: 91540-000
Telefone: +55 51 3308 7423
Fax: 55 55 3221 4175
e-mail: aribeiro@ufrgs.br

Scientific Section
Nutrition

ABSTRACT

Organic acids are considered potential alternatives to antibiotic growth promoters (**AGP**). This experiment was conducted to compare the effect of different supplementation programs of Ava Cid P¹ (consisted of a humic substance, coated sodium butyrate 30% and a small acidifier portion) in the diet on performance, immune response and gut health of broilers. Five dietary regimens were used: 1) birds did not receive Ava Cid P in any phase (Control), 2) birds received 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d (AVA₁₋₂₁), 3) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d and 0.45 kg/t from 22 to 35 d (AVA₁₋₃₅), 4) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d and 0.45 kg/t from 22 to 42 d (AVA₁₋₄₂), 5) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d, 0.45 kg/t from 22 to 35 d and 0.23 kg/t from 36 to 49 d (AVA₁₋₄₉). A complete randomized design was used, involving a 2 × 5 factorial arrangement with 2 sex and 5 supplementation programs, and 7 replications with 15 birds each. The supplementation with Ava Cid P showed no influence on male and female growth performance and goblet cell density ($P > 0.05$). However, it modified the gut morphometry, increasing jejunum villi height at 9 and 35 days ($P < 0.05$). The apparent villus surface area and villi height on birds fed with Ava Cid P during all phases also increased in relation to those who received only in the early phase. The expression of mucin 2 (**MUC2**) and tumor necrosis factor-alpha (**TNF- α**) decreased on birds that received Ava Cid P at 21 days ($P < 0.05$), but no differences were seen for interleukin-1beta (**IL-1 β**) and interleukin-10 (**IL-10**). The results suggest that Ava Cid P can alter the mRNA expression of some inter-leukins, MUC2 and intestinal morphometry in broilers, increasing apparent villus surface area and villi height, which demonstrates the product potential as an alternative growth promoter.

¹ Nutriad, Inc. 201 Flannigan Road IL 60140, Hampshire, USA.

Key words: animal performance, sodium butyrate, gut morphometry, humic acid, immunity, poultry.

INTRODUCTION

A growing concern about the transmission and the proliferation of resistant bacteria via food chain has led to the removal of AGP in livestock by the European Union since 2006 (Brenes and Roura, 2010). Despite the international regulations, the modern intensive farming, high densities, and high yield requirements are still making commercial broiler vulnerable to different stressors, including intestinal and immunological stress, which could be controlled, before and in part, by the AGPs. These facts have been forcing the countries that export animal products to search for alternatives to ensure maximum animal growth without affecting the quality and cost of the final product. In this context, organic acids are one of the possibilities on the set of non-antibiotic growth promoters.

In the animal feed industry, organic acids were originally added to serve as antifungals and antibacterial products against *Salmonella* spp. contaminated feed. (Andreopoulou et al., 2014). They have made great contribution to the profitability in poultry production affecting the intestinal microbiota, the mucosa, and immune system, the protein digestibility, pancreatic secretion, mineral utilization and; therefore the performance (Adil et al., 2010).

Butyric acid is a natural substance present in the gut, milk and feces of most mammals. It is available as Na, K, Mg or Ca salt. In vitro and in vivo studies have shown that butyric acid or its sodium salt can decrease pro-inflammatory cytokine expression and release (Song et al., 2006; Zang et al., 2011; Jiang et al., 2015). Moreover, as a feed additive, the role of butyric acid or its sodium salt has received much attention and some researches have demonstrated positive effects on growth performance, on intestinal integrity and trophic effects on the gastrointestinal tract in broiler chickens (Hu and Guo, 2007; Guilloteau et al., 2010; Jiang et al., 2015).

Humic substances or humates, like reed sedge peat compounds, have been shown to transfer micronutrients from soil to plants, enhance water retention, and improve microbial populations in soils (Peña-Méndez et al., 2005) and are composed of humic acid, fulvic acid and trace minerals. It has growth related effect as well as health protection capacity by changing some physiology and developing immunity in different species of animal (Islam et al. 2005).

The Ava Cid P is composed of a reed sedge peat compound, coated sodium butyrate 30% and a small acidifier portion containing a blend of phosphoric, citric, malic and fumaric acids. The purpose of this study was to evaluate the effect of different supplementation programs of Ava Cid P in the diet, in each phase of growth, on the performance, immune response and gut health of broilers.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at the Piedmont Research Station, North Carolina Department of Agriculture & Consumer Services, NCStation, Salisbury, NC, USA. All procedures were approved by the Animal Care and Welfare Committee of NC State University. One thousand and eighty 1-day-old (540 females, 540 males) broiler chicks Ross 344 x 708, separated by sex, were used. The birds had a range of $42.5 \text{ g} \pm 2.1 \text{ g}$.

The experiment was divided into four phases: Starter (1 to 21 days), Growth (22 to 35 days), Final (36 to 42 days) and Withdrawal (43 to 49 days). Birds were fed with pelleted diet (Table 1), the water and feed were provided *ad libitum*. The experimental design was completely randomized involving a 2×5 factorial arrangement (2 sex \times 5 supplementation programs), with five treatments and seven replicate with 15 birds each.

The experimental diets were: 1) birds didn't receive Ava Cid P in any phase (Control), 2) birds received 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d (AVA₁₋₂₁), 3) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d and 0.45 kg/t from 22 to 35 d (AVA₁₋₃₅), 4) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d and 0.45 kg/t from 22 to 42 d (AVA₁₋₄₂), 5) 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1 to 21 d, 0.45 kg/t from 22 to 35 d and 0.23 kg/t from 36 to 49 d (AVA₁₋₄₉). All the basal corn-soybean meal diets had the same nutrient levels and no addition of coccidiostats, antibiotic growth promoter or any type of enzyme, and followed the recommendations of NRC 1994 and Ross Nutrition Specifications (Table 1).

Body weight (**BW**), feed intake (**FI**), and feed conversion rate (**FCR**) were evaluated at 1, 21, 35, 42 and 49 days.

Histological Analysis

At 9, 35 and 49 days, samples of jejunum and ileum tissue were collected from 5 male birds/treatment (selected within the treatment average weight) to intestinal morphometric and goblet cell density analysis. The tissue samples were immediately rinsed with saline, and fixed in 10% neutral-buffered formalin solution for at least 72 h before processing. A total of three sections of about 2–3 mm in length were taken from a 3 cm fixed jejunum and ileum section collected from each sampled bird. These smaller sections were placed in tissue cassettes and submerged ethanol 70% until processed at the Pathology Laboratory (NC State University, College of Veterinary Medicine, Raleigh, NC, USA). The fixed sections were embedded in paraffin wax, and 5 µm thick transverse sections were cut with a microtome. The 5 µm cut sections were placed on slides and were stained with Lilee Meyer hematoxylin and counter-stained with eosin yellow. Acid mucin was determined by staining the samples sections with

Alcian Blue pH 2.5. A Sony CCD color video camera attached to an Olympus Van-Ox S microscope (Opelco, Washington, DC) were used to visualize the transverse sections placed on slides, with 4X-objective (morphometry) and 10X-objective (goblet cell count). The images were analyzed using an image tool software (AmScope 4.7, Irvine, CA, USA). Villus height, villus apical width at the tip of the villus, villus basal width at the crypt-villus junction, crypt depth, and muscularis depth were measured on 10 villi per sampled bird. The villi height: crypt depth ratio for each bird was calculated by dividing the average of the 10 villi heights measured per bird by the average of the 10 crypt depths measured on the same bird. The following mathematical formula was used to determine apparent villus surface area $\{[(\text{villus tip} + \text{villus base})/2] \times \text{villus height}\}$, according to Iji et al. (2001).

The goblet cell density was calculated on jejunum and ileum of 5 male birds/treatment (selected within the treatment average weight) at 49 days, by the count of the number of Alcian Blue-positive cells along 200 μm linear area/villi (10 villus/bird).

MUC2 and Cytokines Expression

The quantification of mRNA expression of IL-1 β , IL-10, TNF- α e MUC2 (by RT-qPCR) was done at 21, 35 and 49 days, on the jejunum of 5 male birds/treatment. Total RNA was isolated using the RNeasy[®] Mini Kit from Qiagen (Cat. no. 74106) according to the manufacturer's guidelines. Concentration and purity were determined at 260/280 and 260/230 using spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE). Reverse transcription was performed with the Kit cDNA high Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) according to the manufacturer's guidelines.

Relative quantification in real time polymerase chain reaction (PCR) was performed using the Power SYBR[®] green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's guidelines.

Cycling was carried out in the StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems). IL-1 primer sequences were 5'- GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG-3' (forward) and 5'- TGTCGATGTCCCGCATGA-3' (reverse) (Fasina et al. 2008), IL-10 primer sequences were 5'- CATGCTGCTGGGCCTGAA-3' (forward) and 5'- CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG -3' (reverse) (Fasina et al. 2008), TNF- α primer sequences were 5'- GAGCGTTGACTTGGCTGTC-3' (forward) and 5'- AAGCAACAACCAGCTATGCAC-3' (reverse) (Forder et al. 2012), MUC2 primer sequences were 5'- AAGCCAGTCTCCTTCAGTAA-3' (forward) and 5'- TGGTGTGGGAGCAGTGGTT-3' (reverse) (GenBank accession number XM-421035), and GAPDH primer sequences were 5'- GGTAAGTCGGAGTCAACGG-3' (forward) and 5'- TCGATGAAGGGATCATTGATC-3' (reverse) (Beacon Designer).

Relative mRNA abundance was determined using the method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001); Ct values of each sample were standardized for GAPDH RNA.

Statistical analysis

Data were subject to analysis of variance using the GLM procedure of JMP pro 12.0.1 (SAS Inst. Inc., 2015). Tukey's comparison of means test was applied when significant differences occurred at the $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In all phases, the supplementation with Ava Cid P didn't change the performance of males and females birds (Table 2) as described by Zhang et al. (2011). However, when Zhang challenged birds with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) dietary sodium butyrate prevented the reduction of body weight gain and feed intake caused by the LPS challenge. According Edmonds et al. (2014) during heat stress, broilers fed a mixture of humic acid and protected butyric acid have improved growth and feed efficiency along with lower mortalities. Our lack of results on performance may be attributed to the non-challenge environment that the chickens were exposed: they were reared inside of an experimental house, with air conditioning; without any environmental, health or nutritional stress. As well as Zhang et al. (2011), the results of Leeson et al. (2005) suggest that there is no growth promoting response to butyric acid or its sodium salt when chickens are reared in an environment with low pathogens or where health status is high.

Furthermore, in most cases where benefits of dietary butyric acid, humic substances or organic acids supplementation on broilers performance were found, researchers used a higher inclusion on feed (Antongiovanni et al., 2007; Taherpour et al., 2009; Ozturk et al., 2012; Edmonds et al., 2014; Arif et al. 2016). Hu and Guo (2007) using similar level of supplementation, but just of sodium butyrate, reported a positive effect on body weight gain from 0 to 21 days, which was not kept up to 42 days. In addition, the results of Biggs and Parsons (2008) indicated that feeding 1 to 6% of organic acids (citric, gluconic, fumaric, and malic acids), didn't have any consistent effects on growth performance, ME_n, amino acid digestibility or cecal microbial numbers.

The histology analysis showed no differences on the goblet cell density (Table 3), which was unexpected, once previous literature shows an increase on goblet cell counts on unchallenged birds with the use of alternative growth promoters, including butyrate (Kum et al., 2010; Almeida et al., 2014) and a decrease on *Salmonella*-challenged birds feeding clays (Almeida et al., 2014). The differentiation of stem cells in the crypts into goblet cells is increased by inflammation, via stimulation of Krüppel-like factor 4 (**KLF4**), and butyrate can also induce expression of KLF4 (Evans and Liu, 2008).

The morphometric analysis were affected by Ava Cid P inclusion (Table 4 and 5). On Jejunum the villi height increased with Ava Cid P inclusion compared with the control group at 9 d ($P < 0.05$) At 35 d, the treatment AVA₁₋₃₅ had the highest villi height. At 49 d, there were conflicting results: birds on AVA₁₋₄₉ treatment had higher villus compared to AVA₁₋₂₁ and AVA₁₋₄₂ and bigger apparent villus surface area compared to AVA₁₋₂₁, but the treatments didn't differ from the control group. On the Ileum, just at 9d, villus apical width, villus basal width and apparent villus surface area were increased with the Ava Cid P inclusion ($P < 0.05$).

Several authors indicated that butyric acid influences the intestinal morphometry of broilers (Antongiovanni et al., 2007; Panda et al., 2009; Jiang et al., 2015). Butyrate is recognized as the most important respiratory fuel, and effective source of energy for epithelial cells proliferation and it is involved directly and/or indirectly in various mechanisms regulating cellular differentiation, growth, permeability and gene expression (Mroz et al., 2006). Sodium butyrate has been reported to be helpful in maintenance of intestinal villi structure after coccidial challenge (Leeson et al., 2005). In general, the increase of villus height and apparent villus surface area found on the different segments of small intestine of broilers may be attributed to the reduction of the

growth of many pathogenic or non pathogenic intestinal bacteria by the organic acids. So, organic acidifiers reduce intestinal colonization, decrease inflammatory processes at the intestinal mucosa, which increase villus height. Thereby, function of secretion, digestion and absorption of nutrients can be appropriately performed by mucosa (Ghazalah et al., 2011).

In conventional rearing and healthy chickens, as in this study, the benefits of sodium butyrate on small intestinal epithelium is often pointless (Hu and Guo, 2007; Smulikowska et al. 2009). According to Shira et al.(2005) and Panda et al.(2009), butyrate supplementation will be more helpful to young birds, when the intestinal and gut associated lymphoid tissue (GALT) development and maturation happen, especially when there is no protection from antibiotics, which can be inferred from our markedly results at 9 and 35 days. Viola and Vieira (2007), Adil et al. (2010) e Ghazalah et al. (2011) also found influences of organic acids blends on gut morphometry, including enhancement of villus height on supplemented birds. However, on these studies, the organic acids supplementation levels were higher than the levels we used.

Regarding the immune response of the birds, the mRNA expression of MUC2 and TNF- α decreased on birds receiving butyrate compared to the control group at 21 days (Table 6). In the other ages and for the rest of cytokines measured, no significant differences were found between treatments. The decrease in TNF- α was expected, contrary to MUC2 decrease, once butyric acid or its sodium salt can decrease pro-inflammatory cytokine expression and release via inhibition of nuclear factor-kappa B (NF-kB) activation (Segain et al., 2000; Song et al., 2006).

These results are similar to those found by Jiang et al. (2005) and Zhang et al. (2011), where diet supplementation with butyric acid in the first weeks of age, also decreased pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 expression on broiler chickens,

with and without some health challenge. In vitro, Zhou et al. (2014) found that butyrate by itself had no significant effect on mRNA expression of inflammatory cytokines but reduced the expression of IL-1 β , IL-6, IFN- γ and IL-10 in LPS – stimulated chicken macrophage cells.

It has been proposed that organic acids, especially butyric acid, reinforce the intestinal defense barrier by increasing the production of mucins and antimicrobial peptides. According to Willemsen et al. (2003) short chain fatty acids enhanced the prostaglandin E₁/E₂ ratio secreted by subepithelial myofibroblasts on intestine, a profile that may support mucoprotection by enhancing epithelial mucin expression. Furthermore, it has been showed that organic acids have anti-inflammatory properties (Van Immerseel et al, 2010; Vieira et al., 2012). However, contrary to these evidences, our results showed an unpredictable decrease on MUC2. Gaudier et al. (2004), who found that butyrate modulates MUC gene expression in human colonic goblet cells, specifically compared with other SCFA found that this modulation varies according to the MUC gene. It is strongly dependent on the energy source provided to the cells and, in standard culture conditions, butyrate enhanced MUC3 and MUC5B, but not MUC2. They also suggest a different mechanism: that histone deacetylase (HDAC) inhibition can be involved in the action of butyrate on MUC3 expression but not on MUC2, MUC5AC, and MUC5B gene expressions.

In conclusion, we demonstrated that Ava Cid P, without challenge conditions, alters the mRNA expression of TNF- α and MUC2, in early phases, and intestinal morphometry, although in an unstable manner; but it does not modify the performance in broilers. Further studies with health, nutritional or environmental challenges and other levels of the product inclusion are still needed.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge CNPq Brazil for research fellowships

REFERENCES

- Adil S., Banday T., Ahmad Bhad G., Sallahudin M. and Rehman M. 2010. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology and serum biochemistry of broiler chicken. *Vet. Med. Int.* 479-485.
- Almeida, J. A. S., Ponnuraj, N. P., Lee, J. J., Utterback, P., Gaskins, H. R., Dilger, R. N., and Pettigrew, J. E. 2014. Effects of dietary clays on performance and intestinal mucus barrier of broiler chicks challenged with *Salmonella enterica* serovar typhimurium and on goblet cell function in vitro. *Poult. Sci.* 93(4): 839-847.
- Andreopoulou, M., Tsiouris, V. and Georgopoulou, I. 2014. Effects of organic acids on the gut ecosystem and on the performance of broiler chickens. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society.* 65(4): 289-302.
- Antongiovanni, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Leeson, S., Minieri, S., Martini, A. and Cecchi, R. 2007. Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition. *Ital. J. Anim. Sci.* 6: 19–25.
- Arif, M., Rehman, A., Saeed, M., El-Hack, M. E. A., Arain, M. A., Haseebarshad, M, and Abbasi, I. H. 2016. Impacts of dietary humic acid supplementation on growth performance, some blood metabolites and carcass traits of broiler chicks. *Indian Journal of Animal Sciences.* 86(9): 1073-1078.
- Biggs, P. and Parsons, C. M. 2008. The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult. Sci.* 87: 2581-2589.
- Brenes, A. and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158:1–14.

- Edmonds, M. S., Johal, S. and Moreland, S. 2014. Effect of supplemental humic and butyric acid on performance and mortality in broilers raised under various environmental conditions. *Journal of Applied Poultry Research*. 23: 260-267.
- Evans, P. M., and C. Liu. 2008. Roles of krüppel-like factor 4 in normal homeostatis, cancer and stem cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 40: 554–564.
- Fasina, Y. O., Holt, P. S., Moran, E. T., Moore, R. W., Conner, D. E. and McKee, S. R. 2008. Intestinal cytokine response of commercial source broiler chicks to *Salmonella typhimurium* infection. *Poult. Sci.* 87: 1335-1346.
- Forder, R.E.A., Natrass, G.S., Geier, M.S., Hughes, R.J. and Hynd, P.I. 2012. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 91: 1335-1341.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottiere, H.M., De Coppet, P., Buisine, M.P., Aubert, J.P., Laboisse, C., Cherbut, C. and Hoebler, C. 2004. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287: 1168-1174.
- Ghazalah, A. A., Atta, A. M., Elkloub, K., Moustafa, M. E. L. and Shata, R. F. H. 2011. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, nutrients digestibility and health of broiler chicks. *International Journal of Poultry Science*. 10(3): 176-184.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhauit, V., Ducatelle, R., Zabielski, R. and Van Immerseel, F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*. 23: 366–384.
- Hu, Z. and Guo, Y. 2007. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 132:240–249.
- Iji P.A., Saki A. and Tivey D.R. 2001. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. *Br. Poult. Sci.* 42:505–13.

- Islam, K.M.S, Schumacher, A. and Gropp, J.M. 2005. Humic Acid Substances in Animal Agriculture. *Pakistan J Nutr.* 4: 126-134.
- Jiang, Y., Zhang, W., Gao, F. and Zhou, G. 2015. Effect of sodium butyrate on intestinal inflammatory response to lipopolysaccharide in broiler chickens. *Can. J. Anim. Sci.* 95: 389-395.
- Kum, S., Eren, U., Onol, A. G. and Sandikci, M. 2010. Effects of dietary organic acid supplementation on the intestinal mucosa in broilers. *Revue Méd. Vét.* 161(10): 463-468.
- Leeson , S., Namkung , H., Antongiovanni , M. and Lee , E. H. 2005. Effect of butyric acid on the performance and carcass yield on broiler chickens. *Poult. Sci.* 84: 1418–1422.
- Mroz Z., Koopmans S.-J., Bannink A., Partanen K., Krasucki W., Øverland M. and Radcliffe S., 2006. Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in nonruminants. In: R. Mosenthin, J. Zentek, T. Żebrowska (Editors). *Biology of Nutrition in Growing Animals*. Elsevier, Edinburgh (UK), pp. 81-133.
- National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of poultry*. 9th ed. Washington: National Academy Press; 1994.
- Ozturk, E., Ocak, N., Turan, A., Erener, G., Altop, A. and Cankaya, S. 2012. Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. *J Sci Food Agric.* 92: 59-65.
- Panda, A. K., Rao, S. V. R., Raju, M. V. L. N. and Sunder, G. S. 2009. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 22(7): 1026-1031.
- Peña-Méndez, E. M., J. Havel, and J. Patočka. 2005. Humic substances-compounds of still unknown structure: Applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *J. Appl. Biomed.* 3:13–24.

- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- Segain, J., de la Bletiere, D. R., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C. and Galmiche, J. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47: 397–403.
- Shira, E. B., Sklan, D. and Friedman, A. 2005. Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105: 33-45.
- Smulikowska, S., Czerwinski, J., Mieczkowska, A. and Jankowiak, J. 2009. The effect of fat-coated organic acid salts and a feed enzyme on growth performance, nutrient utilization, microflora activity, and morphology of the small intestine in broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences.* 18: 478–489.
- Song, M., Xia, B. and Li, J. 2006. Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1beta, and nuclear factor kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Postgrad. Med. J.* 82: 130-135.
- Taherpour, K., Moravej, H., Shivazad, M., Adibmoradi, M. and Yakhchali, B. 2009. Effects of dietary probiotic, prebiotic and butyric acid glycerides on performance and serum composition in broiler chickens. *African Journal of Biotechnology.* 8(10): 2329-2334.
- Van Immerseel, F., Ducatelle, R., De Vos, M., Boon, B., Van De Wiele, T., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Sas, B., Louis, P. and Flint, H.J. 2010. Butyric acid-producing bacteria as a novel probiotic treatment approach to the treatment of inflammatory bowel disease. *J Med Microbiol* 59:141-143.
- Vieira, E.L., Leonel, A.J., Sad, A.P., Beltrão, N.R., Costa, T.F., Ferreira, T.M., Gomes-Santos, A.C., Faria, A.M., Peluzio, M.C., Cara, D.C. and Alvarez-Leite, J.I. 2012. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J Nutr Biochem.* 23:430-436.

- Viola, E. S. and Vieira, S. L. 2007. Supplementation of organic and inorganic acidifiers in diets for broiler chickens: Performance and intestinal morphology. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(4): 1097-1104.
- Willemsen, L.E., Koetsier, M.A., Van Deventer, S.J. and Van Tol, E.A. 2003. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* 52: 1442-1447.
- Zhang, W.H., Jiang, Y., Zhu, Q.F., Gao, Dr.F., Dai, S.F., Chen, J. and Zhou, G.H. 2011. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 52: 292-301.
- Zhou, Z. Y., Packialakshmi, B., Makkar, S. K., Dridi, S. and Rath, N. C. 2014. Effect of butyrate on immune response of a chicken macrophage cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 162: 24-32.

Table 1. Profile of nutrients and energy of basal diet

Nutrients	Broiler Starter (1-21 days)	Broiler Grower (21 – 35 days)	Broiler Finisher (35 – 49 days)
ME, kcal/kg	2950	3050	3150
Crude protein, %	23.2	20.3	17.0
Crude fat, %	2.99	4.79	5.58
Crude fibre, %	2.32	2.57	2.49
Calcium, %	0.90	0.90	0.80
Total phosphorus, %	0.72	0.70	0.63
Avail. Phos.	0.45	0.45	0.40
Sodium, %	0.20	0.20	0.20
Potassium, %	1.12	0.93	0.74
Chloride, %	0.32	0.33	0.35
Na+k-cl, meq/kg	285	232	179
Arginine, %	1.56	1.30	1.04
Dig. Arg., %	1.44	1.19	0.95
Lysine, %	1.30	1.14	0.97
Dig. Lys, %	1.16	1.02	0.87
Methionine, %	0.57	0.49	0.41
Dig. Met chicken, %	0.54	0.45	0.38
Met + cys, %	0.95	0.83	0.71
Dig. Tsaa, %	0.79	0.69	0.59
Threonine, %	0.89	0.76	0.65
Dig. Thr, %	0.78	0.66	0.56
Tryptophan, %	0.26	0.22	0.17
Dig. Trp, %	0.23	0.19	0.15
Leucine, %	1.94	1.77	1.53
Isoleucine, %	0.99	0.84	0.68
Valine, %	1.18	1.03	0.84

Table 2. Body weight, feed intake and feed conversion ratio of males and females in the experimental period.

	Male			Female		
Age: 21	BW(g)	FI(g)	FCR	BW(g)	FI(g)	FCR
Control	720	1,016	1.418	571	862	1.433
AVA ₁₋₂₁	694	979	1.398	596	840	1.412
SEM*	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>P</i> value	0.2969	0.1116	0.5378	0.3679	0.4645	0.4770
Age: 35	BW(g)	FI(g)	FCR	BW(g)	FI(g)	FCR
Control	2,007	3,010	1.570	1,633	2,561	1.640
AVA ₁₋₂₁	1,916	2,927	1.610	1,646	2,483	1.590
AVA ₁₋₃₅	1,956	2,928	1.570	1,633	2,534	1.630
SEM	0.03	0.04	0.02	0.05	0.04	0.05
<i>P</i> value	0.3019	0.3918	0.0940	0.9533	0.4428	0.5809
Age: 42	BW(g)	FI(g)	FCR	BW(g)	FI(g)	FCR
Control	2,628	4,211	1.760	2,188	3,602	1.720
AVA ₁₋₂₁	2,560	4,116	1.740	2,169	3,497	1.670
AVA ₁₋₃₅	2,604	4,103	1.710	2,198	3,592	1.720
AVA ₁₋₄₂	2,548	4,087	1.760	2,113	3,544	1.730
AVA ₁₋₄₉	2,681	4,265	1.730	2,185	3,562	1.700
SEM	0.03	0.03	0.01	0.02	0.02	0.01
<i>P</i> value	0.4672	0.3646	0.5588	0.6176	0.7325	0.7661
Age: 49	BW(g)	FI(g)	FCR	BW(g)	FI(g)	FCR
Control	3,391	5,637	1.900	2,792	4,832	1.800
AVA ₁₋₂₁	3,347	5,497	1.870	2,764	4,682	1.740
AVA ₁₋₃₅	3,357	5,500	1.840	2,865	4,815	1.800
AVA ₁₋₄₂	3,365	5,474	1.860	2,731	4,689	1.780
AVA ₁₋₄₉	3,475	5,732	1.860	2,867	4,820	1.750
SEM	0.03	0.05	0.02	0.03	0.03	0.02
<i>P</i> value	0.6632	0.3036	0.7958	0.3832	0.4678	0.7128

^{a-b} Means in a column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

Control: basal diet without supplementation; AVA₁₋₂₁: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d; AVA₁₋₃₅: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-35 d; AVA₁₋₄₂: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-42 d; AVA₁₋₄₉: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d, 0.45 kg/t from 22-35 d and 0.23 kg/t from 36-49 d.

* Pooled SEM (standard error of the means).

Table 3. Goblet cell density of jejunum and ileum at 49 days of chickens fed Ava Cid P in different regimens

Treatment	Jejunum	Ileum
Control	531.80	902.80
AVA ₁₋₂₁	519.60	786.00
AVA ₁₋₃₅	478.80	776.80
AVA ₁₋₄₂	461.40	914.80
AVA ₁₋₄₉	578.25	871.20
SEM	21.78	57.81
<i>P</i> value	0.5348	0.9242

Control: basal diet without supplementation; AVA₁₋₂₁: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d; AVA₁₋₃₅: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-35 d; AVA₁₋₄₂: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-42 d; AVA₁₋₄₉: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d, 0.45 kg/t from 22-35 d and 0.23 kg/t from 36-49 d.

* Pooled SEM (standard error of the means).

Table 4 - Effect of the treatments on the jejunum morphometric analysis at 9, 35 and 49d

Age: 9d	Villi height (µm)	Upper villi width (µm)	Botton villi width(µm)	Crypth deep (µm)	Muscularis thickness (µm)	Ratio	Surface of villi (µm²)
Control	542 ^b	134	174	103	105	5.47	83,321
AVA ₁₋₂₁	650 ^a	139	166	112	93.3	5.92	99,199
SEM	16.83	5.43	7.57	3.87	2.95	0.17	4,936
<i>P</i> value	0.0400	0.7820	0.7380	0.4740	0.2111	0.4160	0.3220
Age: 35d	Villi height (µm)	Upper villi width (µm)	Botton villi width(µm)	Crypth deep (µm)	Muscularis thickness (µm)	Ratio	Surface of villi (µm²)
Control	1061 ^b	154	169	124	144	9.18	173,733
AVA ₁₋₂₁	1101 ^b	156	141	111	144	10.10	162,523
AVA ₁₋₃₅	1403 ^a	119	130	154	159	8.70	175,569
SEM	54.56	7.82	5.92	8.43	6.91	0.44	11,345
<i>P</i> value	0.0130	0.1000	0.0680	0.0910	0.6310	0.4960	0.9170
Age: 49d	Villi height (µm)	Upper villi width (µm)	Botton villi width(µm)	Crypth deep (µm)	Muscularis thickness (µm)	Ratio	Surface of villi (µm²)
Control	1301 ^{ab}	161 ^{ab}	192 ^{ab}	156	195	8.56	210,137 ^{ab}
AVA ₁₋₂₁	995 ^b	148 ^b	161 ^b	142	216	7.02	146,734 ^b
AVA ₁₋₃₅	1244 ^{ab}	198 ^a	228 ^a	132	187	9.00	268,105 ^a
AVA ₁₋₄₂	1040 ^b	190 ^{ab}	215 ^{ab}	130	180	8.26	214,695 ^{ab}
AVA ₁₋₄₉	1459 ^a	170 ^{ab}	206 ^{ab}	147	199	9.10	274,864 ^a
SEM	23.14	4.56	6.60	3.91	7.14	0.21	7,390
<i>P</i> value	0.0170	0.0310	0.0220	0.5100	0.2310	0.3070	0.0110

^{a-b} Means in a column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

Control: basal diet without supplementation; AVA₁₋₂₁: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d; AVA₁₋₃₅: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-35 d; AVA₁₋₄₂: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-42 d; AVA₁₋₄₉: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d, 0.45 kg/t from 22-35 d and 0.23 kg/t from 36-49 d.

* Pooled SEM (standard error of the means).

Table 5 - Effect of the treatments on the ileum morphometric analysis at 9, 35 and 49d

Age: 9d	Villi height (μm)	Upper villi width (μm)	Botton villi width(μm)	Crypth deep (μm)	Muscularis thickness (μm)	Ratio	Surface of villi (μm^2)
Control	425	91.6 ^b	102 ^b	93.8	93.9	4.92	41,410 ^b
AVA ₁₋₂₁	473	116 ^a	142 ^a	91.8	102	5.32	62,663 ^a
SEM	10.41	4.47	5.58	3.64	3.90	0.19	3,438
<i>P</i> value	0.0660	0.0380	0.0040	0.8450	0.4320	0.4460	0.0170
Age: 35d	Villi height (μm)	Upper villi width (μm)	Botton villi width(μm)	Crypth deep (μm)	Muscularis thickness (μm)	Ratio	Surface of villi (μm^2)
Control	941	132	144	112	137	8.36	133,045
AVA ₁₋₂₁	872	103	125	110	154	8.19	105,637
AVA ₁₋₃₅	973	120	124	131	137	7.28	116,025
SEM	24.43	4.14	4.92	4.18	6.77	0.26	5,669
<i>P</i> value	0.2860	0.1420	0.3510	0.0630	0.6240	0.1890	0.3790
Age: 49d	Villi height (μm)	Upper villi width (μm)	Botton villi width(μm)	Crypth deep (μm)	Muscularis thickness (μm)	Ratio	Surface of villi (μm^2)
Control	742	148	183	134	233	6.27	139,845
AVA ₁₋₂₁	778	169	202	128	202	6.10	144,028
AVA ₁₋₃₅	814	152	219	138	199	6.21	158,357
AVA ₁₋₄₂	852	165	219	142	221	6.01	164,718
AVA ₁₋₄₉	874	181	212	127	218	6.68	166,832
SEM	23.14	4.56	6.60	3.91	7.14	0.21	7,390
<i>P</i> value	0.4210	0.1370	0.4130	0.7320	0.5560	0.8960	0.7300

^{a-b} Means in a column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

Control: basal diet without supplementation; AVA₁₋₂₁: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d; AVA₁₋₃₅: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-35 d; AVA₁₋₄₂: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-42 d; AVA₁₋₄₉: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d, 0.45 kg/t from 22-35 d and 0.23 kg/t from 36-49 d.

* Pooled SEM (standard error of the means).

Table 6 - Effect of the treatments on the cytokines and MUC2 expression

Age: 21	IL1	IL10	MUC	TNF
Control	0.999	1.000	1.000 ^a	1.000 ^a
AVA ₁₋₂₁	0.989	0.992	0.984 ^b	0.991 ^b
SEM	0.005	0.004	0.004	0.002
<i>P</i> value	0.2400	0.3120	0.0030	0.0411
Age: 35	IL1	IL10	MUC	TNF
Control	1.003	1.000	1.000	0.998
AVA ₁₋₂₁	1.001	1.013	0.999	1.003
AVA ₁₋₃₅	0.994	1.008	1.008	1.007
SEM	0.002	0.003	0.002	0.002
<i>P</i> value	0.1730	0.3144	0.0610	0.1140
Age: 49	IL1	IL10	MUC	TNF
Control	1.018	1.018	1.063	1.003
AVA ₁₋₂₁	1.059	1.055	1.056	1.061
AVA ₁₋₃₅	1.047	1.038	1.052	1.063
AVA ₁₋₄₂	1.046	1.040	1.046	1.053
AVA ₁₋₄₉	1.060	1.061	1.054	1.069
SEM	0.009	0.007	0.008	0.008
<i>P</i> value	0.4260	0.4042	0.1827	0.1620

^{a-b} Means in a column without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

Control: basal diet without supplementation; AVA₁₋₂₁: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d; AVA₁₋₃₅: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-35 d; AVA₁₋₄₂: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d and 0.45 kg/t from 22-42 d; AVA₁₋₄₉: 0.91 kg/t of Ava Cid P from 1-21 d, 0.45 kg/t from 22-35 d and 0.23 kg/t from 36-49 d.

* Pooled SEM (standard error of the means).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação com a combinação de AGCC e substância húmica nas dietas de frangos de corte, em diferentes doses e em diferentes fases de crescimento, não promoveu nenhum efeito sobre o peso corporal, consumo alimentar e conversão alimentar das aves, possivelmente pelo fato das mesmas não terem sofrido desafios ambientais, sanitários ou nutricionais durante todo o período experimental (1-42 dias de idade). Estas observações divergem das relatadas previamente em outras pesquisas, sendo que pesquisas anteriores submeteram as aves a situações de desafio e utilizaram diferentes níveis de inclusão desta combinação.

Também não foi observada qualquer alteração no número de células caliciformes das aves com a suplementação do produto. No entanto, o produto se mostrou capaz de alterar, mesmo que de forma inconstante, a morfometria intestinal dos frangos, sendo estas alterações mais consistentes nos períodos mais precoces. O Ava Cid P é capaz de aumentar a altura de vilosidades e a área superficial aparente dos vilos nos diferentes seguimentos do intestino. Ao final da pesquisa conclui-se que outras metodologias de análise de qualidade intestinal poderiam ser aplicadas, como por exemplo determinação da densidade e integridade de vilos, análises imunohistoquímicas para determinação dos índices de proliferação celular total e de enterócitos nas criptas e vilos (Aguiar, 2014; Cheat et al., 2015), já que apenas os resultados das análises morfométricas realizadas não foram indicadores de melhoria efetiva da qualidade intestinal, pois não refletiram melhorias no desempenho zootécnico.

O produto também altera a expressão de mRNA de TNF- α e MUC2, na fase inicial das aves, demonstrando os efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios do ácido butírico, previamente relatados na literatura, principalmente no que se refere à redução da expressão de TNF- α .

Não foram encontrados estudos anteriores envolvendo a combinação de AGCC e substância húmica, na dieta de frangos de corte, que analisassem a morfometria intestinal e resposta imune. Por isso este trabalho demonstra de forma inédita a ação desta combinação nessas respostas e abre portas para novas investigações a este respeito. Além disso a pesquisa demonstrou a necessidade de mais estudos com desafios sanitários, ambientais e nutricionais, uma análise com um controle positivo (com AGP) e outros níveis de inclusão do produto para concluir se o mesmo pode influenciar de forma positiva o desempenho das aves e ser usado como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento em dietas de frango de corte.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Innate Immunity. In: **Cellular and molecular immunology**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 55 – 88, 2012

ABDEL-FATTAH, S. A. et al. Thyroid activity of broiler chicks fed supplemental organic acids. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 7, p. 215–222, 2008.

ABDELQADER, A.; AL-FATAFATAH, A. R. Effect of dietary butyric acid on performance, intestinal morphology, microflora composition and intestinal recovery of heat-stressed broilers. **Livestock Science**, Amsterdam, v.183, p. 78-83, 2016.

ADEREM, A.; R. J. ULEVITCH. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, London, v. 406, p. 782–787, 2000.

ADIL S. et al. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology and serum biochemistry of broiler chicken. **Veterinary Medicine International** [on-line], Cairo, v.2010, art. 479485, 7 p., 2010.

AGUIAR, E. F. **Avaliação óptica, ultraestrutural e expressão de proliferação celular da mucosa entérica de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico**. 2014. 108 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

AHSAN, U. et al. Sodium butyrate in chicken nutrition: The dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.72, n.2, p. 265-275, 2016.

AKSU, T.; BOZKURT, A. S. Effect of dietary essential oils and/or humic acids on broiler performance, microbial population of intestinal content and antibody titres in the summer season. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, Kars, v.15, n. 2, p. 185 - 190, 2009.

AKYUREK, H.; YEL, A. Influence of dietary thymol and carvacrol preparation and/or an organic acid blend on growth performance, digestive organs and intestinal microbiota of broiler chickens. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v.5, p. 979-984, 2011.

ALBUQUERQUE, R. de. Antimicrobianos como promotores de crescimento. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.; GÓRNIK, S.L. (Org.) **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. p. 149 – 159.

AL-SULTAN, S. I. et al. Comparative effects of using prebiotic, probiotic, synbiotic and acidifier on growth performance, intestinal microbiology and histomorphology of broiler chicks. **Japanese Journal of Veterinary Research**, Sapporo, v. 64, p. S187-S195, 2016.

ANTONGIOVANNI, M. et al. Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 6, p. 19–25, 2007.

ARIF, M. et al. Impacts of dietary humic acid supplementation on growth performance, some blood metabolites and carcass traits of broiler chicks. **The Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 86, n. 9, p. 1073-1078, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2016: produção brasileira**. São Paulo, 2016. 133 p. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2017.

AVISITE. **Estatísticas e preços: exportação de carne de frango**. 2017. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/economia/>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

AWAAD, M. H. H. et al. Effect of Na-butyrate supplementation on electromicroscopy, virulence gene expression analysis and gut integrity of experimentally induced *Salmonella enteritidis* in broiler chickens. **Asian Journal of Poultry Science**, [S.l.], v.10, p.126-133, 2016.

BIGGS, P.; PARSONS, C. M. The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.87, p. 2581-2589, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Resistência aos Antimicrobianos**. Dez. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/material-genetico/registencia-antimicrobianos>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

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

CALAÇA, G. M. **Ácidos orgânicos no controle de *Salmonella enteritidis* em frangos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella enteritidis* e *Eimeria tenella***. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

CAMPOS, M. P. A. et al. Use of fumaric acid in the diets on the performance of broiler chickens with low metabolisable energy. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, p. 35 – 39, 2004.

CASSENEGO, A. P. V. et al. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. and fed with diets containing different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, p. 480 - 488, 2011.

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

ÇELIK, K.; UZATICI, A.; AKIN, A. E. Effects of dietary humic acid and *Saccharomyces cerevisiae* on performance and biochemical parameters of broiler chickens. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 3, p. 344 – 350, 2008.

CHAMBA, F. et al. Effect of partially protected sodium butyrate on performance, digestive organs, intestinal villi and *E. coli* development in broilers chickens. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 13, p. 390-396, 2014.

CHEAT, S. et al. Nivalenol has a greater impact than deoxynivalenol on pig jejunum mucosa in vitro on explants and in vivo on intestinal loops. **Toxins**, Basel, v. 7, p. 1945-1961, 2015.

CHIEN, S. J. et al. Fulvic acid attenuates homocysteine-induced cyclooxygenase-2 expression in human monocytes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 15, art. 61, 2015.

CHOWDHURY, R. et al. Effect of citric acid, avilamycin and their combination on the performance, tibia ash, and immune status of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 1616-1622, 2009.

COLLIGNON, P. Vancomycin-resistant enterococci and use of avoparcin in animal feed: is there a link? **Medical Journal of Australia**, Sydney, v. 171, p. 144-146, 1999.

COOK, M. E. et al. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1301-1305, 1993.

CZERWIŃSKI, J. et al. Effects of sodium butyrate and salinomycin upon intestinal microbiota, mucosal morphology and performance of broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 66, n. 2, p. 102 – 116, 2012.

DAHIYA, J. P. et al. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.129, p. 60–88, 2006.

DIBNER, J. J.; E BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v.11, p.453-463, 2002.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 634–643, 2005.

DONOGHUE, D.J. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 618-621, 2003.

EDMONDS, M. S.; JOHAL, S.; MORELAND, S. Effect of supplemental humic and butyric acid on performance and mortality in broilers raised under various environmental conditions. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 23, p. 260-267, 2014.

ELLIOTT, S. D.; BARNES, E. M. Changes in serological type and antibiotic resistance on Lancefield group D Streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. **Journal Genetics Microbiology**, London, v. 20, n.2, p. 426-433, 1959.

FERNÁNDEZ-RUBIO, C. et al. Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella enteritidis* infection. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 943 – 948, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Veterinary Feed Directive. **Federal Register**, v. 80, n. 106. Jun.2015. (Rules and Regulations). Disponível em: <<https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2015-06-03/pdf/2015-13393.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

GARCÍA, V. et al. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 16, p. 555 – 562, 2007.

GASKILL, M. Strictly granola. **American Way**, New York, June, v. 1, p. 42–45, 2002.

GAUDIER, E. et al. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. **The American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 287, p. 1168 - 1174, 2004.

GHAZALAH, A. A. et al. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, nutrients digestibility and health of broiler chicks. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.10, p. 176-184, 2011.

GONZALES, E.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B. Antifúngicos. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.; GÓRNIK, S.L. (Org.) **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. p. 175 – 187.

GUILLOTEAU, P. et al. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 23, p. 366-384, 2010.

HAQUE, M.N. et al. Effect of dietary citric acid, flavomycin and their combination on the performance, tibia ash and immune status of broiler. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 90, p. 57 – 63, 2010.

HASAN, G. et al. Ameliorative effect of esterified glucomannan, sodium bentonite, and humic acid on humoral immunity of broilers during chronic aflatoxicosis. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Kerela, v. 33, n. 5, p. 419 – 425, 2009.

HASAN, G.; TOLOEI, T.; HABIBI, M. Efficacy of esterified glucomannan, sodium bentonite and humic acid to counteract experimental aflatoxicosis on antibody titers against Newcastle disease in broilers. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 26, p. 4127 - 4131, 2010.

HASHEMI, S. R. et al. Intestinal histomorphology changes and serum biochemistry responses of broiler chickens fed herbal plant (*Euphorbia hirta*) and mix of acidifier. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, Rasht, v. 4, p. 95-103, 2014.

HERNÁNDEZ, F. et al. Effect of formic acid on performance, digestibility, intestinal histomorphology and plasma metabolite levels of broiler chickens. **British Poultry Science**, Abingdon, v 47, p. 50 – 56, 2006.

HU, Z. AND GUO, Y. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens.

Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, v. 132, p. 240 – 249, 2007.

ISLAM, K. M. S.; SCHUHMACHER, A.; GROPP, J. M. Humic acid substances in animal agriculture. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 4, n. 3, p. 126 – 134, 2005.

JACKSON, S. K. et al. The ability of antigen, but not interleukin-2, to promote n-butyrate-induced T helper 1 cell anergy is associated with increased expression and altered association patterns of cyclin-dependent kinase inhibitors. **Immunology**, Oxford, v. 106, p. 486 – 495, 2002.

JERZSELE, A. et al. Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 837-843, 2012.

JIANG, Y. et al. Effect of sodium butyrate on intestinal inflammatory response to lipopolysaccharide in broiler chickens. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 95, p. 389-395, 2015.

JOBIN, C.; SARTOR, R. B. The I κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, Bethesda, v. 278, p. 451- 462, 2000.

KELLEY, T. R. et al. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 243-247, 1998.

KHAN, S. H.; IQBAL, J. Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. **Journal of Applied Animal Research**, Izatnagar, v. 44, n. 1, p. 359 – 369, 2016.

KLASING, K. C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 48, n. 5, p. 525 – 537, 2007.

KLASING, K. C.; LESHCHINSKY, T. V. Interactions between nutrition and immunity. In: GERSHWIN, M. E.; GERMAN, J. B.; KEEN, C. L. (Ed.). **Nutrition and immunology**: principles and practice. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1999. p. 363 – 373.

KLÖCKING, R. et al. Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, Oxford, v. 13, p. 231 – 249, 2002.

KOCABAĞLI, N. et al. The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. **Poultry Science**, Champaign, v. 81, p. 227–230, 2002.

KOUTSOS, E. A.; KLASING, K. C. Factors modulating the avian immune system. In: SCHAT, K. A.; KASPERS, B.; KAISER, P. (Ed.). **Avian Immunology**. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2014. p. 299 – 308.

KUCUKERSAN, S. The effects of humic acid on egg production and egg traits of laying hen. **Veterinární medicína – Czech**, Praha, v. 50, p. 406 - 410, 2005.

KUM, S. et al. Effects of dietary organic acid supplementation on the intestinal mucosa in broilers. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 161, p. 463-468, 2010.

KYNER, D. et al. Effect of sodium butyrate on lymphocyte activation. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 144, p. 1647 – 1678, 1976.

LABRO, M. T. Antibacterial agents-phagocytes: new concepts for old in immunomodulation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.10, p.11–21, 1998.

LABRO, M. T. Interference of antibacterial agents with phagocyte function: immunomodulation or immuno-fairy tales? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, p. 615–650, 2000.

LILLEHOJ, H. S.; LEE, K. W. Immune modulation of innate immunity as alternatives-to-antibiotics strategies to mitigate the use of drugs in poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 1286–1291, 2012.

LOHAKARE, J. D. et al. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance and immunity of commercial broilers. **Journal of Applied Animal Research**, Abingdon, v.14, p.10 – 19, 2005.

LÜHRS H. et al. Butyrate inhibits interleukin-1-mediated nuclear factor-kappa B activation in human epithelial cells. **Digestive Diseases and Sciences**, Dordrecht, v. 46, p. 1968–1973, 2001.

MAIORKA et al. Effect of broiler breeder age and glutamine supplementation on the development of the intestinal mucosa of 7-day-old chicks. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 18, n.1, p. 17-22, 2016.

MCCARTNEY, E. O banimentos de antibióticos promotores de crescimento na EU: implicações globais para a nutrição animal. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE

AVICULTURA, 9., 2008, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008. p. 13 – 33.

MROZ Z. et al. Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in nonruminants. In: MOSENTHIN, R.; ZENTEK, J.; ŽEBROWSKA, T. (Ed.). **Biology of Nutrition in Growing Animals**. Edinburgh (UK): Elsevier, 2006. p. 81-133.

NAGARAJU, R. et al. Effect of dietary supplementation of humic acids on performance of broilers. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 84, n.4, p. 447 – 452, 2014.

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

OZTURK, E. et al. Effects of humic substances supplementation provided through drinking water on performance, meat color and cecal microbial population of broilers. In: ULUSAL HAYVAN BESLEME KONGRESI, 4., 2007, [Haziran]. **Proceedings...** [Haziran], 2007. p. 243–245.

OZTURK, E., et al. Effects of humic substances supplementation provided through drinking water on performance, carcass traits and meat quality of broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 94, p. 78 – 85, 2010.

OZTURK, E., et al. Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. **The Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 92, p. 59 - 65, 2012.

PALERMO NETO, J. **Fatos e mitos sobre resistência bacteriana a antimicrobianos usados em produção animal**. Campinas, 2015. Disponível em: <http://facta.org.br/fatos-e-mitos-sobre-resistencia-bacteriana-a-antimicrobianos-usados-em-producao-animal/>. Acesso em: 21 fev. 2017.

PANDA, A. K. et al. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 22, n. 7, p. 1026 - 1031, 2009.

PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 1831/2003 de 22 de Setembro de 2003. **Jornal Oficial da União Européia**, L 268 de 18/10/2003 p. 0029 – 0043. Disponível em: <http://eur->

lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1831:PT:HTML>.
Acesso em: 20 jun. 2011.

PEREIRA et al. Organic acid blend in diets of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 24, p. 387 – 393, 2015.

RATH, N. C.; HUFF, W. E.; HUFF, G. R. Effects of humic acid on broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, p. 410 – 414, 2006.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 632–639, 2003.

RIEDE, U. N. et al. Humate-induced activation of human granulocytes. **Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology**, Berlin, v. 60, p. 27 – 34, 1991.

RITZHAUPT, A. et al. The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. **Journal of Physiology**, Oxford, v. 507, p. 819 – 830, 1998.

RODRÍGUEZ-LECOMPTE, J. C. et al. The effect of microbial-nutrient interaction on the immune system of young chicks after early probiotic and organic acid administration. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2246 – 2254, 2012.

RUBIN, L. L. et al. Effects of methionine and arginine dietary levels on the immunity of broiler chickens submitted to immunological stimuli. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, n. 4, p. 241 – 247, 2007a.

RUBIN, L. L. et al. Influence of sulfur amino acid levels in diets of broiler chickens submitted to immune stress. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 53 – 59, 2007b.

RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, p.363-370, 1992.

SAKATA, T.; ENGELHARDT, W. V. Stimulatory effect of short chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 74A, n. 2, p. 459 – 462, 1983.

ŠAMUDOVSÁ, A.; DEMETEROVÁ, M. Effect of diet supplemented with natural humic compounds and sodium humate on performance and selected

metabolic variables in broiler chickens. **Acta Veterinaria Brunensis**, Brno, v. 79, p. 385 – 393, 2010.

SANTANA, E. S. et al. Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.7, n.12, p. 1 – 21, 2011. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/uso%20de%20antibioticos.pdf>> . Acesso em: 25 jun. 2011.

SEGAIN, J. et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, New York, v. 47, p. 397–403, 2000.

SHIRA, E. B., SKLAN, D. AND FRIEDMAN, A. Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 105, p. 33-45, 2005.

SMULIKOWSKA, S. et al. The effect of fat-coated organic acid salts and a feed enzyme on growth performance, nutrient utilization, microflora activity, and morphology of the small intestine in broiler chickens. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Warszawa, v.18, p. 478–489, 2009.

SONG, M.; XIA, B.; LI, J. Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1beta, and nuclear factor kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 82 , p. 130-135, 2006.

STOKSTAD, E. L. R. et al. The multiple nature of the animal protein factor. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 180, p. 647 – 654, 1949.

STOKSTAD, E. L. R.; JUKES, T. H. Further Observations on the “Animal Protein Factor”. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 73, n. 3, p. 523 – 528, 1950.

SUKHOTERINA, Y. **Only These 2 Restaurants Rated A for Antibiotic-Free Meat, 20 Big Chains Failed Miserably**. Althealthworks, Dec., 2015. Disponível em: <<http://althealthworks.com/8359/only-these-2-restaurants-rated-a-for-antibiotic-free-meat-20-big-chains-failed-completelyelena/>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

SUNKARA, L. T.; JIANG, W.; ZHANG, G. Modulation of Antimicrobial Host Defense Peptide Gene Expression by Free Fatty Acids. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 11, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0049558.

TAPPENDEN, K. A.; MCBURNEY, M. I. Systemic short-chain fatty acids rapidly alter gastrointestinal structure, function, and expression of early response

genes. **Digestive Diseases and Sciences**, Dordrecht, v. 43, p.1526 – 1536. 1998.

TIMBERMONT, L. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 39, p. 117 – 121, 2010.

TRCKOVA, M. Peat as a feed supplement for animals: a review. **Veterinární medicína – Czech**, Praha, v. 50, p. 361-377, 2005.

VAN DER WIELEN, P. W. J. J. et al. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.6, p. 2536 – 2540, 2000.

VAN IMMERSEEL, F. et al. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 69 – 74, 2004.

VAN IMMERSEEL, F. et al. Supplementation of Coated Butyric Acid in the Feed Reduces Colonization and Shedding of *Salmonella* in Poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 1851–1856, 2005.

VAN RENSBURG, C. E. The antiinflammatory properties of humic substances: a mini review. **Phytotherapy Research**, London, v. 29, n. 6, p. 791 – 795, 2015.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.4, supl, p. 1097 – 1104, 2007.

WALKER, A. W. et al. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3692 – 3700, 2005.

WEBER, G. M. et al. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on performance of broiler chickens as revealed by a meta-analysis of 4 growth trials in various locations. **Poultry Science**, Champaign, v.91, p. 2820-2828, 2012.

WEBER, T. E. et al. Effects of dietary humic and butyric acid on growth performance and response to lipopolysaccharide in young pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 4172 – 4179, 2014.

WHITE HOUSE. **National action plan for combating antibiotic-resistant bacteria.** Washington, DC, 2015. Disponível em: <https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/docs/national_action_plan_for_combating_antibiotic-resistant_bacteria.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food.** Report of a WHO consultation, Switzerland, jun. 2000. Disponível em: <www.who.int/emc> Acesso em: 10 jun. 2011.

WILLEMSSEN, L. E. et al. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. **Gut**, New York, v. 52, p. 1442 - 1447, 2003.

ZHANG, W. H. et al. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 52, p. 292 - 301, 2011.

ZHOU, Z. Y. et al. Effect of butyrate on immune response of a chicken macrophage cell line. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 162, p. 24 - 32, 2014.

ZRALÝ, Z.; PÍSAŘÍKOVÁ, B.; NAVRÁTILOVÁ, M. The effect of humic acid on mercury accumulation in chicken organs and muscle tissues. **Czech Journal of Animal Science**, Praha, v. 53, p. 472 – 478, 2008.

ANEXOS

Anexo A- Instrução aos autores para publicação na Revista Poultry Science

POULTRY SCIENCE INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Editorial Policies and Procedures

Poultry Science publishes the results of fundamental and applied research concerning poultry, poultry products, and avian species in general. Submitted manuscripts shall provide new facts or confirmatory data. Papers dealing with experimental design, teaching, extension endeavors, or those of historical or biographical interest may also be appropriate. A limited number of review papers will be considered for publication if they contribute significant additional knowledge, or synthesis of knowledge, to a subject area. Papers that have been, or are scheduled to be, published elsewhere will not be accepted. Publication of a preliminary report, such as an abstract, does not preclude consideration of a complete report for publication as long as it has not been published in full in a proceedings or similar scientific publication; appropriate identification of previously published preliminary reports should be provided in a title page footnote. Translation of an article into other languages for publication requires approval by the editor-in-chief. Opinions or views expressed in papers published by *Poultry Science* are those of the author(s) and do not necessarily represent the opinion of the Poultry Science Association or the editor-in-chief.

Contact Information for Journal Staff

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Colin G. Scanes, 335 Chapman Hall, 2310 East Hartford Ave., University of Wisconsin, Milwaukee, WI 53201; e-mail: scanes@uwm.edu (withcc to cscanes@wi.rr.com).

For assistance with Manuscript Central, manuscript submission and copyright forms, or page charge and offprint orders, contact Jeremy Holzner, editorial assistant,

Headquarters Office, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822 (FAX: 217-378-4083; jeremyh@assoqh.org).

For other information or to submit a paper, contact Susan Pollock, managing editor, Headquarters Office, Poultry Science Association, Inc., 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822 (telephone: 217-356-7641; FAX: 217- 378-4083; journals@assoqh.org).

Care and Use of Animals

Authors must make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments shall be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in *Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*, 1st revised edition, 1999 (Association Headquarters, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822); and, if applicable, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (United States Department of Human Health and Services, National Institutes of Health, Publication Number ISBN 0-309-05377-3, 1996); or *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 2nd ed. Volume 1, 1993 (Canadian Council on Animal Care). Methods of killing experimental animals must be described in the text. In describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified. Intra-abdominal and intrathoracic invasive surgery requires anesthesia. This includes castration.

The editor-in-chief of *Poultry Science* may refuse to publish manuscripts that are not compatible with these guides. If rejected solely on that basis, however, the paper may be resubmitted for reconsideration when accompanied by a written verification that a committee on animal care in research has approved the experimental design and procedures involved.

Types of Articles

Full-Length Articles. The majority of papers published in *Poultry Science* are full-length articles. The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts, apparatus, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in *Poultry Science* must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

Research Notes. Research Notes are short notes giving the results of complete experiments but are less comprehensive than full-length articles. Preliminary or progress reports will not be accepted.

The running head shall be "RESEARCH NOTE." Authors must also indicate the section under which the manuscript is to be reviewed on the title page of the manuscript and on the Manuscript Submission and Copyright Release Form. Research Notes will be published as a subsection of the scientific section in which they were reviewed. Research Notes are limited to five printed pages including tables and figures. Manuscripts should be prepared according to the guidelines for full-length articles.

Symposium Papers. The symposium organizer or chair must present the proposal and tentative budget to the Board of Directors at the summer meeting one full year before the symposium is to be scheduled. The symposium chair must then develop detailed symposium plans, including a formal outline of the talks approved and full budgetary expectations, which must be brought to the

Board of Directors at the January meeting prior to the meeting at which the symposium is scheduled.

The symposium chair must decide whether or not the symposium is to be published and will inform the editor-in-chief of this decision at the January meeting. If the decision is not to publish the symposium, the individual authors retain the right to submit their papers for consideration for the journal as ordinary manuscripts.

If publication is decided upon, all manuscript style and form guidelines of the journal shall be followed.

Manuscripts must be prepared electronically, including figures and tables, and then uploaded onto the *Poultry Science* Manuscript Central site within 2 weeks after the annual meeting. The symposium chair will review the papers and, if necessary, return them to the authors for revision. The symposium chair then forwards the revised manuscript to the editor-in-chief for final review. Final revisions by the author and recommendations for acceptance or rejection by the chair must be completed by December 31 of the year in which the symposium was presented. Manuscripts not meeting this deadline will not be included in the published symposium proceedings.

Symposium papers must be prepared in accordance with the guidelines for full-length articles and are subject to review. Offprints and costs of pages are the responsibility of the author.

Invited Papers. Invited papers, such as the World's Poultry Science Association lecture, should be submitted online; the editorial office will then make these papers available to the editor-in-chief. These papers are subject to review, and all manuscript style and form guidelines of the journal shall be followed. Invited papers are exempt from page charges but not offprint charges.

Review Papers. Review papers are accepted only if they provide new knowledge or a high-caliber synthesis of important knowledge. Reviews are not exempt from page charges. All *Poultry Science* guidelines for style and form apply.

Invited Reviews. Invited Reviews will be approximately 10 published pages and in review format. The editor-in-chief will send invitations to the authors and then review these contributions when they are submitted. Nominations or suggestions for potential timely reviews are welcomed and should be sent directly to the editor-in-chief.

Contemporary Issues. Contemporary Issues in *Poultry Science* will address critical issues facing poultry scientists and the poultry industry. As such, submissions to this section should be of interest to any poultry scientist, to the industry, to instructors and faculty teaching contemporary issues classes, and to undergraduate and graduate students. The section will consist of short papers (approximately 2 published pages) written in essay format and will include an abstract, appropriate subheadings, and references.

Rapid Communications. We aim for receipt-to-decision times of a month or less, and accepted papers will have priority for publication in the next available issue of *Poultry Science*. These papers will present informative and significant new findings, such as tissue-specific gene expression profile data with full-length cDNA and genomic gene structure characterization. These

papers will be short (2 to 4 published pages), adhere to journal format, and include references and an abstract. Rapid Communications should **not** be preliminary reports or incomplete studies. Authors will select Rapid Communications as the paper type when submitting the paper.

Book Reviews. *Poultry Science* publishes reviews of books considered to be of interest to the readers. The editor-in-chief ordinarily solicits reviews. Unsolicited reviews must be sent directly to the editor-in-chief for approval. Book reviews shall be prepared in accordance to the style and form requirements of the journal, and they are subject to editorial revision. No page charges will be assessed.

Letters to the Editor. The purpose of letters will be to discuss, critique, or expand on scientific points made in articles recently published in *Poultry Science*. Introduction of unpublished data will not be allowed, nor will material based on conjecture or speculation. Letters must be received within 6 months of an article's publication.

Letters will be limited to 400 words and 5 references (approximately 3 double-spaced, typed pages including references). Letters shall have a title. Author name(s) and affiliation(s) shall be placed between the end of the text and list of references. Letters will be sent electronically directly to the editor-in-chief for consideration. The author(s) of the original paper(s) will be provided a copy of the letter and offered the opportunity to submit for consideration a reply within 30 days. Replies will have the same page restrictions and format as letters, and the titles shall end with "—Reply." Letters and replies will be published together. Acceptability of letters will be decided by the editor-in-chief. Letters and replies shall follow appropriate *Poultry Science* format and may be edited by the editor-in-chief and a technical editor. If multiple letters on the same topic are received, a representative letter concerning a specific article will be published. All letters may not be published. Letters and replies will be published as space permits.

SUBMISSION OF ELECTRONIC

MANUSCRIPTS

Authors should submit their papers electronically (<http://mc.manuscriptcentral.com/ps>). Detailed instructions for submitting electronically are provided online at that site. Authors who are unable to submit electronically should contact the editorial office (jeremyh@assoqh.org) for assistance.

Copyright Agreement

Authors shall complete the Manuscript Submission and Copyright Release form for each new manuscript submission; faxed copies are acceptable. The form is published in *Poultry Science* as space permits and is available online (<http://ps.fass.org>). The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright

Release Form and must be completed by all authors before publication can proceed. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of coauthors.

Persons unable to sign copyright agreements, such as federal employees, must indicate the reason for exemption on the form.

The Poultry Science Association grants to the author the right of republication in any book of which he or she is the author or editor, subject only to giving proper credit to the original journal publication of the article by the Association.

The Poultry Science Association, Inc. retains the copyright to all materials accepted for publication in the journal. Please address requests for permission to reproduce published material to the editor-in-chief. All tables must be original material. If an author wishes to present data previously published in tabular form, copyright permission to reproduce the table must be obtained by the author and forwarded to the PSA editorial office, even when the format of the table submitted with the manuscript is different than the table already published. If an author desires to reprint a figure published elsewhere, copyright permission to use the figure must be obtained by the author and forwarded to the PSA editorial office.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

After a manuscript is submitted electronically, the editorial office informs the appropriate section editor, who assigns two reviewers, at least one of whom is an associate editor. Each reviewer has 3 weeks to review the manuscript, after which his or her comments are forwarded to the section editor. The section editor may recommend rejection or acceptance at this point, after which the manuscript and reviewer comments are made available to the editor-in-chief for a final decision. More commonly, the manuscript will be sent back to the corresponding author for revision according to the guidelines of the reviewers. Authors have 6 weeks to complete the revision, which shall be returned to the section editor. Failure to return the manuscript within 6 weeks will cause the paper to be purged from the files. Purged manuscripts may be reconsidered, but they will have to be processed as new manuscripts.

Section editors handle all initial correspondence with authors during the review process. The editor-in-chief will notify the author of the final decision to accept or reject. Rejected manuscripts can be resubmitted only with an invitation from the section editor or editor-in-chief.

Revised versions of previously rejected manuscripts are treated as new submissions. Therefore, authors must complete a new Manuscript Submission and Copyright Release Form.

PRODUCTION OF PROOFS

Accepted manuscripts are forwarded by the editor-in-chief to the editorial office for technical editing and typesetting. At this point the technical editor may contact the authors for missing information or figure revisions. The manuscript is then typeset, figures reproduced, and author proofs prepared.

Proofs

Author proofs of all manuscripts will be provided to the corresponding author. Author proofs should be read carefully and checked against the typed manuscript, because the responsibility for proofreading is with the author(s). Corrections may be returned by fax, mail, or e-mail. For faxed or mailed corrections, changes to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof. If extensive editing is required, corrections should be provided on a separate sheet of paper with a symbol indicating location on the proof. Changes sent by e-mail to the technical editor must indicate page, column, and line numbers for each correction to be made on the proof. Corrections can also be marked using the note and highlight tools to indicate necessary changes. Author alterations to copy exceeding 10% of the cost of composition will be charged to the author.

Editor queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication. Proof corrections should be made and returned to the technical editor within 48 hours of receipt.

Publication Charges and Offprints *Poultry Science* has two options available for the publication of articles: conventional page charges and Open Access (OA). **OA.** For authors who wish to publish their papers OA (freely available to everyone when the issue is posted online), authors will pay the OA fee when proofs are returned to the editorial office. Charges for OA are \$2,400 if at least one author is a current professional member of PSA; the charge is \$3,100 when no author is a professional member of PSA.

Conventional Page Charges. The current charge for publication is \$100 per printed page (or fraction thereof) in the journal if at least one author is a professional member of PSA. If no author is a member of PSA, the publication charge is \$170 per journal page.

Offprints and Color Charges. Offprints may be ordered at an additional charge. Authors who submit articles containing color illustrations are responsible for paying the additional charge for color printing, including the printing of any reprints they order, and must agree in writing prior to publication to pay the additional charges.

When the galley proof is sent, the author is asked to complete an offprint order requesting the number of offprints desired and the name of the institution, agency, or individual responsible for publication charges.

MANUSCRIPT PREPARATION:

STYLE AND FORM

General

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in *The American Heritage Dictionary, Webster's*

Third International Dictionary, or the *Oxford American English Dictionary*. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 6th ed. Council

of Biology Editors Style Manual Committee. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

Authors should prepare the main text, tables, and figure captions in MS Word. Details on figure preparation and file formats are provided in the Figures section of these instructions.

Preparing the Manuscript File

Manuscripts should be typed double-spaced, with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points. All special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using MathType from Design Science (<http://www.dessci.com>). Equations created using the new Equation Builder feature in Microsoft Word 2007 may not be compatible with earlier versions of Word or other software used in our journal composition system. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript (not placed in the text). Failure to follow these instructions may result in an immediate rejection of the manuscript.

Headings

Major Headings. Major headings are centered (except ABSTRACT), all capitals, boldface, and consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION (or RESULTS AND DISCUSSION), ACKNOWLEDGMENTS (optional), APPENDIX (optional), and REFERENCES.

First Subheadings. First subheadings are placed on a separate line, begin at the left margin, the first letter of all important words is capitalized, and the headings are boldface and italic. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second Subheadings. Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word should be capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

Title Page

The title page shall begin with a running head (short title) of not more than 45 characters. The running head is centered, is in all capital letters, and shall appear on the top of the title page. No abbreviations should be used.

The title of the paper must be in boldface; the first letter of the article title and proper names are capitalized, and the remainder of the title is lowercase. The title must have no abbreviations, and numbers must be given in words rather than in numerals (e.g., One-Day-Old Broilers).

Under the title, names of authors should be typed with initial capital letters and a space between initials (e.g., T. E. Smith). Affiliations will be footnoted using the following symbols: *, †, ‡, §, #, ||, and be placed below the author names. Do not give authors' titles, positions, or degrees. Numbered footnotes

may be used to provide supplementary information, such as present address, acknowledgment of grants, and experiment station or journal series number. The corresponding author should be indicated with a numbered footnote (e.g.,¹Corresponding author: myname@university.edu). Note that there is no period after the corresponding author's e-mail address.

The title page shall include the name and full address of the corresponding author. Telephone and FAX numbers and e-mail address must also be provided. The title page must indicate the appropriate scientific section for the paper (i.e., Education and Production; Environment, Well-Being, and Behavior; Genetics; Immunology, Health, and Disease; Metabolism and Nutrition; Molecular, Cellular, and Developmental Biology; Physiology, Endocrinology, and Reproduction; or Processing, Products, and Food Safety).

Authors may create a full title page as a one-page document, in a file separate from the rest of the paper. This file can be uploaded and marked "not for review." Authors who choose to upload manuscripts with a full title page at the beginning will have their papers forwarded to reviewers as is.

Abbreviations

Author-derived abbreviations should be defined at first use in the abstract and again in the body of the manuscript. The abbreviation will be shown in bold type at first use in the body of the manuscript. Refer to the Miscellaneous Usage Notes for more information on abbreviations.

Abstract

The Abstract disseminates scientific information through abstracting journals and through convenience for the readers. The Abstract, consisting of not more than 325 words, appears at the beginning of the manuscript with the word ABSTRACT without a following period. It must summarize the major objectives, methods, results, conclusions, and practical applications of the research.

The Abstract must consist of complete sentences and use of abbreviations should be limited. References to other work and footnotes are not permitted. The Abstract and Key Words must be on a separate sheet of paper.

Key Words

The Abstract shall be followed by a maximum of five key words or phrases to be used for subject indexing. These should include important words from the title and the running head and should be singular, not plural, terms (e.g., broiler, not broilers). Authors should consult a current "Subject Index " in *Poultry Science* for additional

key words. Key words should be formatted as follows:

Key words: . . .

Introduction

The Introduction, while brief, should provide the reader with information necessary for understanding research presented in the paper. Previous work on the topic should be summarized, and the objectives of the current research must be clearly stated.

Materials and Methods

All sources of products, equipment, and chemicals used in the experiments must be specified parenthetically at first mention in text, tables, and figures [i.e., (model 123, ABC Corp., Provo, UT)]. Model and catalog numbers should be included. Information shall include the full corporate name (including division, branch, or other subordinate part of the corporation, if applicable), city, and state (country if outside the United States), or Web address. Street addresses need not be given unless the reader would not be able to determine the full address for mailing purposes easily by consulting standard references.

Age, sex, breed, and strain or genetic stock of animals used in the experiments shall be specified. Animal care guidelines should be referenced if appropriate.

Papers must contain analyzed values for those dietary ingredients that are crucial to the experiment. In other papers, authors should state whether experimental diets meet or exceed the National Research Council (1994) requirements as appropriate. If not, crude protein and metabolizable energy levels should be stated. For layer diets, calcium and phosphorus contents should also be specified.

When describing the composition of diets and vitamin premixes, the concentration of vitamins A and E should be expressed as IU/kg on the basis of the following equivalents:

Vitamin A

1 IU = 0.3 μg of all-*trans* retinol

1 IU = 0.344 μg of retinyl acetate

1 IU = 0.552 μg of retinyl palmitate

1 IU = 0.60 μg of β -carotene

Vitamin E

1 IU = 1 mg of dl- α -tocopheryl acetate

1 IU = 0.91 mg of dl- α -tocopherol

1 IU = 0.67 mg of dl- α -tocopherol

In the instance of vitamin D3, cholecalciferol is the acceptable term on the basis that 1 IU of vitamin D3 = 0.025 μg of cholecalciferol.

The sources of vitamins A and E must be specified in parentheses immediately following the stated concentrations.

Statistical Analysis. Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable.

Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions.

When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately. The experimental unit is the smallest unit to which an individual treatment is imposed. For group-fed animals, the group of animals in the pen is the experimental unit; therefore, groups must be replicated. Repeated chemical analyses of the same sample usually do not constitute independent experimental units. Measurements on the same experimental unit over time also are not independent and must not be considered as independent experimental units. For analysis of time effects, use timesequence analysis.

Usual assumptions are that errors in the statistical models are normally and independently distributed with constant variance. Most standard methods are robust to deviations from these assumptions, but occasionally data transformations or other techniques are helpful. For example, it is recommended that percentage data between 0 and 20 and between 80 and 100 be subjected to arc sin transformation prior to analysis. Most statistical procedures are based on the assumption that experimental units have been assigned to treatments at random. If animals are stratified by ancestry or weight or if some other initial measurement should be accounted for, the model should include a blocking factor, or the initial measurement should be included as a covariate.

A parameter [mean (μ), variance (σ^2)], which defines or describes a population, is estimated by a statistic (\bar{x} , s^2).

The term **parameter** is not appropriate to describe a variable, observation, trait, characteristic, or measurement taken in an experiment.

Standard designs are adequately described by name and size (e.g., “a randomized complete block design with 6 treatments in 5 blocks”). For a factorial set of treatments, an adequate description might be as follows: “Total sulfur amino acids at 0.70 or 0.80% of the diet and Lys at 1.10%, 1.20%, or 1.30% of the diet were used in a 2 × 3 factorial arrangement in 5 randomized complete blocks consisting of initial BW.” Note that **a factorial arrangement is not a design**; the term “design” refers to the method of grouping experimental units into homogeneous groups or blocks (i.e., the way in which the randomization is restricted).

Standard deviation refers to the variability in a sample or a population. The standard error (calculated from error variance) is the estimated sampling error of a statistic such as the sample mean. When a standard deviation or standard error is given, the number of degrees of freedom on which it rests should be specified. When any statistical value (as mean or difference of 2 means) is mentioned, its standard error or confidence limit should be given. The fact that

differences are not “statistically significant” is no reason for omitting standard errors. They are of value when results from several experiments are combined in the future. They also are useful to the reader as measures of efficiency of experimental techniques. A value attached by “ \pm ” to a number implies that the second value is its standard error (not its standard deviation). Adequate reporting may require only 1) the number of observations, 2) arithmetic treatment means, and 3) an estimate of experimental error. The pooled standard error of the mean is the preferred estimate of experimental error. Standard errors need not be presented separately for each mean unless the means are based on different numbers of observations or the heterogeneity of the error variance is to be emphasized. Presenting individual standard errors clutters the presentation and can mislead readers.

For more complex experiments, tables of subclass means and tables of analyses of variance or covariance may be included. When the analysis of variance contains several error terms, such as in split-plot and repeated measures designs, the text should indicate clearly which mean square was used for the denominator of each F statistic.

Unbalanced factorial data can present special problems.

Accordingly, it is well to state how the computing was done and how the parameters were estimated. Approximations should be accompanied by cautions concerning possible biases. Contrasts (preferably orthogonal) are used to answer specific questions for which the experiment was designed; they should form the basis for comparing treatment means. Nonorthogonal contrasts may be evaluated by Bonferroni t statistics. The exact contrasts tested should be described for the reader. Multiple-range tests are not appropriate when treatments are orthogonally arranged.

Fixed-range, pairwise, multiple-comparison tests should be used only to compare means of treatments that are unstructured or not related. Least squares means are the correct means to use for all data, but arithmetic means are identical to least squares means unless the design is unbalanced or contains missing values or an adjustment is being made for a covariate. In factorial treatment arrangements, means for main effects should be presented when important interactions are not present. However, means for individual treatment combinations also should be provided in table or text so that future researchers may combine data from several experiments to detect important interactions. An interaction may not be detected in a given experiment because of a limitation in the number of observations.

The terms significant and highly significant traditionally have been reserved for $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; however, reporting the P -value is preferred to the use of these terms. For example, use “. . . there was a difference ($P < 0.05$) between control and treated samples” rather than “. . . there was a significant ($P < 0.05$) difference between control and treated samples.” When available, the observed significance level (e.g., $P = 0.027$) should be presented rather than merely $P < 0.05$ or $P < 0.01$, thereby allowing the reader to decide what to reject.

Other probability (α) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled. Do not report P values to more than 3 places after the decimal. Regardless of the probability level used, failure to reject a hypothesis

should be based on the relative consequences of type I and II errors. A “nonsignificant” relationship should not be interpreted to suggest the absence of a relationship.

An inadequate number of experimental units or insufficient control of variation limits the power to detect relationships.

Avoid the ambiguous use of $P > 0.05$ to declare nonsignificance, such as indicating that a difference is not significant at $P > 0.05$ and subsequently declaring another difference significant (or a tendency) at $P < 0.09$. In addition, readers may incorrectly interpret the use of $P > 0.05$ as the probability of a β error, not an α error.

Present only meaningful digits. A practical rule is to round values so that the change caused by rounding is less than one-tenth of the standard error. Such rounding increases the variance of the reported value by less than 1%, so that less than 1% of the relevant information contained in the data is sacrificed. In most cases, 2 or 3 significant digits (not decimal places) are sufficient.

Results and Discussion

Results and Discussion sections may be combined, or they may appear in separate sections. If separate, the Results section shall contain only the results and summary of the author’s experiments; there should be no literature comparisons. Those comparisons should appear in the Discussion section.

Acknowledgments

An Acknowledgments section, if desired, shall follow the Discussion section. Acknowledgments of individuals should include affiliations but not titles, such as Dr., Mr., or Ms. Affiliations shall include institution, city, and state. Review copies shall have authors’ institutions omitted.

Appendix

A technical Appendix, if desired, shall follow the Discussion section or Acknowledgments, if present. The Appendix may contain supplementary material, explanations, and elaborations that are not essential to other major sections but are helpful to the reader. Novel computer programs or mathematical computations would be appropriate. The Appendix will not be a repository for raw data.

References

Citations in Text. In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires that the authors’ names be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982; Jones, 1988a,b; Jones et al., 1993). Where there are more than two authors of one article, the first author’s name is followed by the abbreviation et al. More than one article listed in the

same sentence of text must be in chronological order first, and alphabetical order for two publications in the same year.

Work that has not been accepted for publication shall be listed in the text as: “J. E. Jones (institution, city, and state, personal communication).” The author’s own unpublished work should be listed in the text as “(J. Smith, unpublished data).” Personal communications and unpublished data must not be included in the References section.

References Section. To be listed in the References section, papers must be published or accepted for publication.

Manuscripts submitted for publication can be cited as “personal communication” or “unpublished data” in the text.

Citation of abstracts, conference proceedings, and other works that have not been peer reviewed is strongly discouraged unless essential to the paper. Abstract and proceedings references are not appropriate citations in the Materials and Methods section of a paper.

In the References section, references shall first be listed alphabetically by author(s) last name(s), and then chronologically. The year of publication follows the authors’ names. As with text citations, two or more publications by the same author or set of authors in the same year shall be differentiated by adding lowercase letters after the date. The dates for papers with the same first author that would be abbreviated in the text as et al., even though the second and subsequent authors differ, shall also be differentiated by letters. All authors’ names must appear in the Reference section. Journals shall be abbreviated according to the conventional ISO abbreviations given in journals database of the National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). One-word titles must be spelled out.

Inclusive page numbers must be provided. Sample references are given below. Consult recent issues of *Poultry Science* for examples not included below.

Article:

Bagley, L. G., and V. L. Christensen. 1991. Hatchability and physiology of turkey embryos incubated at sea level with increased eggshell permeability. *Poult. Sci.* 70:1412–1418.

Bagley, L. G., V. L. Christensen, and R. P. Gildersleeve. 1990. Hematological indices of turkey embryos incubated at high altitude as affected by oxygen and shell permeability. *Poult. Sci.* 69:2035–2039.

Witter, R. L., and I. M. Gimeno. 2006. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek’s disease virus. *Avian Dis.* doi:10.1637/7498-010306R.1

Book:

Metcalfe, J., M. K. Stock, and R. L. Ingermann. 1984. The effects of oxygen on growth and development of the chick embryo. Pages 205-219 in *Respiration and Metabolism of Embryonic Vertebrates*. R. S. Seymour, ed. Dr. W. Junk, Dordrecht, the Netherlands.

National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Federal Register: Department of Agriculture, Plant and Animal Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collection at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. Fed. Regist. 69:10137–10151.

Other:

Choct, M., and R. J. Hughes. 1996. Long-chain hydrocarbons as a marker for digestibility studies in poultry. Proc. Aust. Poult. Sci. Symp. 8:186. (Abstr.)

Dyro, F. M. 2005. Arsenic. WebMD. <http://www.emedicine.com/neuro/topic20.htm> Accessed Feb. 2006. El Halawani, M. E., and I. Rosenboim. 2004. Method to enhance reproductive performance in poultry. Univ. Minnesota, assignee. US Pat. No. 6,766,767.

Hruby, M., J. C. Remus, and E. E. M. Pierson. 2004. Nutritional strategies to meet the challenge of feeding poultry without antibiotic growth promotants. Proc. 2nd Mid-Atlantic Nutr. Conf., Timonium, MD. Univ. Maryland, College Park.

Luzuriaga, D. A. 1999. Application of computer vision and electronic nose technologies for quality assessment of color and odor of shrimp and salmon. PhD Diss. Univ. Florida, Gainesville. Peak, S. D., and J. Brake. 2000. The influence of feeding program on broiler breeder male mortality. Poult. Sci. 79(Suppl. 1):2. (Abstr.)

Tables

Tables must be created using the MS Word table feature and inserted in the manuscript after the references section. When possible, tables should be organized to fit across the page without running broadside. Be aware of the dimensions of the printed page when planning tables (use of more than 15 columns will create layout problems).

Place the table number and title on the same line above the table. The table title does not require a period.

Do not use vertical lines and use few horizontal lines. Use of bold and italic typefaces in the table body should be done sparingly; such use must be defined in a footnote.

Each table must be on a separate page. To facilitate placement of all tables into the manuscript file (just after the references) authors should use “section breaks” rather than “page breaks” at the end of the manuscript (before the tables) and between tables.

Units of measure for each variable must be indicated.

Papers with several tables must use consistent format. All columns must have appropriate headings.

Abbreviations not found on the inside front cover of the journal must be defined in each table and must match those used in the text. Footnotes to tables should be marked by superscript numbers. Each footnote should begin a new line.

Superscript letters shall be used for the separation of means in the body of the table and explanatory footnotes must be provided [i.e., "Means within a row lacking a common superscript differ ($P < 0.05$)."]; other significant P -values may be specified. Comparison of means within rows and columns should be indicated by different series

of superscripts (e.g., a,b, . . . in rows; x-z . . . in columns). The first alphabetical letter in the series (e.g., a or A) shall be used to indicate the largest mean. Lowercase superscripts indicate $P \leq 0.05$. Uppercase letters indicate $P \leq 0.01$ or less.

Probability values may be indicated as follows: $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, and $\dagger P \leq 0.10$. Consult a recent issue of *Poultry Science* for examples of tables.

Figures

To facilitate review, figures should be placed at the end of the manuscript (separated by section breaks). Each figure should be placed on a separate page, and identified by the manuscript number and the figure number.

A figure with multiple panels or parts should appear on one page (e.g., if Figure 1 has parts a, b, and c, place all of these on the same page). Figure captions should be typed (double spaced) on a separate page.

- **Figure Size.** Prepare figures at final size for publication. Figures should be prepared to fit one column (8.9 cm wide), 2 columns (14 cm wide), or full-page width (19 cm wide).
- **Font Size.** Ensure that all type within the figure and axis labels are readable at final publication size. A minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.
- **Fonts.** Use Helvetica or Times New Roman. Symbols may be inserted using the Symbol palette in Times New Roman.
- **Line Weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long-dash, short-dash, and dotted lines. Avoid the use of color, gray, or shaded lines, as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.
- **Axis Labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses, and should be consistent within a manuscript.
- **Shading and Fill Patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed (e.g., black, white, gray, diagonal stripes). Avoid the use of multiple shades of gray, as they will not be easily distinguishable in print.
- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only: □, ■, ○, ●, ▲, ▼, n, ,, e, r, +, or ×. Symbols should be defined in a key on the figure if possible.

- **File Formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG. Avoid PowerPoint files and other formats. For the best printed quality, line art should be prepared at 600 ppi. Grayscale and color images and photomicrographs should be at least 300 ppi.

- **Grayscale Figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale.

Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.

- **Color Figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).

- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.

- **Caption.** The caption should provide sufficient information that the figure can be understood with excessive reference to the text. All author-derived abbreviations used in the figure should be defined in the caption.

- **General Tips.** Avoid the use of three-dimensional bar charts, unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and key are clear and easily readable at final publication size.

Color Figures. Submitted color images should be at least 300 ppi. The cost to publish each color figure is \$995; a surcharge for color reprints ordered will be assessed.

Authors must agree in writing to bear the costs of color production after acceptance and prior to publication of the paper. The form “Color Charge Agreement” is available on the journal web site (<http://ps.fass.org>) and should be completed and returned to PSA Headquarters upon submission.

Miscellaneous Usage Notes

Abbreviations. Abbreviations shall not be used in the title, key words, or to begin sentences, except when they are widely known throughout science (e.g., DNA, RNA) or are terms better known by abbreviation (e.g., IgG, CD).

A helpful criterion for use of abbreviation is whether it has been accepted into thesauri and indexes widely used for searching major bibliographic databases in the scientific field. Abbreviations may be used in heads within the paper, if they have been first defined within the text. The inside back cover of every issue of the journal lists abbreviations that can be used without definition. The list is subject to revision at any time, so authors should always consult the most recent issue of the journal (or the updated list at <http://ps.fass.org/>) for relevant information.

Abbreviations are allowed when they help the flow of the manuscript; however, excessive use of abbreviations can confuse the reader. The suitability of abbreviations will be evaluated by the reviewers and editors during the review process and by the technical editor during editing.

As a rule, author-derived abbreviations should be in all capital letters. Terms used less than three times must be spelled out in full rather than abbreviated.

All terms are to be spelled out in full with the abbreviation following in bold type in parentheses the first time they are mentioned in the main body of the text. Abbreviations shall be used consistently thereafter, rather than the full term.

The abstract, text, each table, and each figure must be understood independently of each other. Therefore, abbreviations shall be defined within each of these units of the manuscript.

Plural abbreviations do not require "s." Chemical symbols and three-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Units of measure, except those in the standard *Poultry Science* abbreviation list, should be abbreviated as listed in the *CRC Handbook for Chemistry and Physics* (CRC Press, 2000 Corporate Blvd., Boca Raton, FL 33431) and do not need to be defined.

The following abbreviations may be used without definition in *Poultry Science*.

A adenine

ADG average daily gain

ADFI average daily feed intake

AME apparent metabolizable energy

AMEn nitrogen-corrected apparent metabolizable energy

ANOVA analysis of variance

B cell bursal-derived, bursal-equivalent derived cell

bp base pairs

BSA bovine serum albumin

BW body weight

C cytosine

cDNA complementary DNA

cfu colony-forming units

CI confidence interval

CP crude protein

cpm counts per minute

CV coefficient of variation

d day

df degrees of freedom

DM dry matter

DNA deoxyribonucleic acid

EDTA ethylenediaminetetraacetate

ELISA enzyme-linked immunosorbent antibody assay

EST expressed sequence tag

g gram

g gravity

G guanine

GAT glutamic acid-alanine-tyrosine

G:F gain-to-feed ratio

GLM general linear model

h hour

HEPES *N*-2-hydroxyethyl piperazine-*N'*-ethane-sulfonic acid

HPLC high-performance (high-pressure) liquid chromatography

ICU international chick units

Ig immunoglobulin

i.m. intramuscular
i.p. intraperitoneal
IU international units
i.v. intravenous
kb kilobase pairs
kDa kilodalton
L liter*
L:D hours light:hours darkness in a photoperiod
m meter
 μ _micro
M molar
MAS marker-assisted selection
ME metabolizable energy
MEn nitrogen-corrected metabolizable energy
MHC major histocompatibility complex
mRNA messenger ribonucleic acid
min minute
mo month
MS mean square
n number of observations
N normal
NAD nicotinamide adenine dinucleotide
NADH reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NRC National Research Council
NS not significant
PAGE polyacrylamide gel electrophoresis
PBS phosphate-buffered saline
PCR polymerase chain reaction
pfu plaque-forming units
QTL quantitative trait loci
r correlation coefficient
*r*² coefficient of determination, simple
*R*² coefficient of determination, multiple
RFLP restriction fragment length polymorphism
RH relative humidity
RIA radioimmunoassay
RNA ribonucleic acid
rpm revolutions per minute
s second
s.c. subcutaneous
SD standard deviation
SDS sodium dodecyl sulfate
SE standard error
SEM standard error of the mean
SRBC sheep red blood cells
SNP single nucleotide polymorphism
T thymine
TBA thiobarbituric acid

T cell thymic-derived cell
 TME true metabolizable energy
 TME_n nitrogen-corrected true metabolizable energy
 Tris tris(hydroxymethyl)aminomethane
 TSAA total sulfur amino acids
 U uridine
 USDA United States Department of Agriculture
 UV ultraviolet
 vol/vol volume to volume
 vs. versus
 wt/vol weight to volume
 wt/wt weight to weight
 wk week
 yr year
 *Also capitalized with any combination, e.g., mL.

International Words and Phrases. Non-English words in common usage (defined in recent editions of standard dictionaries) will not appear in italics (e.g., *in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *a priori*). However, genus and species of plants, animals, or bacteria and viruses should be italicized. Authors must indicate accent marks and other diacriticals on international names and institutions. German nouns shall begin with capital letters.

Capitalization. Breed and variety names are to be capitalized (e.g., Single Comb White Leghorn).

Number Style. Numbers less than 1 shall be written with preceding zeros (e.g., 0.75). All numbers shall be written as digits. Measures must be in the metric system; however, US equivalents may be given in parentheses. *Poultry Science* requires that measures of energy be given in calories rather than joules, but the equivalent in joules may be shown in parentheses or in a footnote to tables.

Units of measure not preceded by numbers must be written out rather than abbreviated (e.g., lysine content was measured in milligrams per kilogram of diet) unless used parenthetically. Measures of variation must be defined in the Abstract and in the body of the paper at first use.

Units of measure for feed conversion or feed efficiency shall be provided (i.e., g:g).

Nucleotide Sequences. Nucleotide sequence data must relate to poultry or poultry pathogens and must complement biological data published in the same or a companion paper. If sequences are excessively long, it is suggested that the most relevant sections of the data be published in *Poultry Science* and the remaining sequences be submitted to one of the sequence databases. Acceptance for publication is contingent on the submission of sequence data to one of the databases. The following statement should appear as a footnote to the title on the title page of the manuscript. "The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to GenBank Submission (Mail Stop K710, Los Alamos National Laboratories, Los Alamos, NM 87545) nucleotide sequence database and have been assigned the accession number XNNNNN."

Publication of the description of molecular clones is assumed by the editors to place them in the public sector. Therefore, they shall be made available to other scientists for research purposes.

Nucleotide sequences must be submitted as cameraready figures no larger than 21.6 × 27.9 cm in standard (portrait) orientation. Abbreviations should follow *Poultry Science* guidelines.

General Usage. Note that “and/or” is not permitted; choose the more appropriate meaning or use “x or y or both.”

Use the slant line only when it means “per” with numbered units of measure or “divided by” in equations. Use only one slant line in a given expression (e.g., g/d per chick). The slant line may not be used to indicate ratios or mixtures.

Use “to” instead of a hyphen to indicate a range. Insert spaces around all signs (except slant lines) of operation (=, −, +, ×, >, or <, etc.) when these signs occur between two items.

Items in a series should be separated by commas (e.g., a, b, and c).

Restrict the use of “while” and “since” to meanings related to time. Appropriate substitutes include “and,” “but,” or “whereas” for “while” and “because” or “although” for “since.”

Leading (initial) zeros should be used with numbers less than 1 (e.g., 0.01).

Commas should be used in numbers greater than 999. Registered (®) and trademark (™) symbols should not be used, unless as part of an article title in the References section. Trademarked product names should be capitalized.

Supplemental Information (Online)

The following information is available online and updated regularly. Please refer to these pages when preparing a manuscript for submission.

Journal Title Abbreviations. A list of standard abbreviations for common journal titles is available online (<http://ps.fass.org/misc/ifora.dtl>).

SI Units. The following site (National Institute of Standards and Technology) provides a comprehensive guide to SI units and usage: <http://physics.nist.gov/Pubs/SP811/contents.html>

Figure and Table Preparation Guidelines. Current detailed information on figure and table preparation can be found at <http://ps.fass.org/misc/ifora.dtl>

Manuscript Central Instructions. Manuscripts are submitted online (<http://mc.manuscriptcentral.com/psa>). Full user instructions for using the Manuscript Central system are available on the Manuscript Central home page.