

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

**PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGO DE
CORTE: DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E ANÁLISE DE RESÍDUOS
(ANTIMICROBIANOS) NA CAMA DE AVIÁRIO.**

IONE IOLANDA DOS SANTOS

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL

2002

**PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGO DE
CORTE: DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E ANÁLISE DE RESÍDUOS
(ANTIMICROBIANOS) NA CAMA DE AVIÁRIO.**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de **Mestre em Agroecossistemas**, do
Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina

Apresentada por
IONE IOLANDA DOS SANTOS*

FLORIANÓPOLIS, MAIO 2002

*Engenheira Agrônoma

SANTOS, Ione Iolanda dos. *Promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte: desempenho zootécnico e análise de resíduos (antimicrobianos) na cama de aviário*. Florianópolis, 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^á. Marília T. Sangoi Padilha
Defesa: 27/05/2002

O uso de [Promotores de crescimento] [antimicrobianos] na alimentação de frangos de corte pode ser apontado como um contaminante da [cama de aviário], podendo trazer riscos para o ambiente e a saúde humana. Propõe-se a compostagem para viabilização da cama de aviário como adubo, além da substituição das substâncias antimicrobianas promotoras de crescimento pelos [probióticos], os quais podem trazer menos riscos a saúde humana, animal e ao

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS
FLORIANÓPOLIS – SC

DISSERTAÇÃO

Submetida por Ione Iolanda dos Santos
Como um dos requisitos para a obtenção do Grau de

MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. José C. F. Padilha
CCA/UFSC
Presidente

Prof. Paulo E. Lovato
CCA/UFSC

Prof. Renato Irgang
CCA/UFSC

Rogério Maggioni
Frangos Macedo S.A.

Aprovada em 27/04/2002

Prof^ª. Marília T. Sangoi Padilha
Orientadora

Prof. Anicleto Poli
Co-orientador

Prof. Luiz Renato D'Agostini
Coordenador do PPGAGR

À Sofia e Luiza, pelo amor,
carinho e compreensão.

À Marília T. Sangoi Padilha e Anicleto Poli,
pela orientação, oportunidade
e confiança.

AGRADECIMENTOS

Minha homenagem e agradecimento especial,

Aos meus pais e meus irmãos, pelo incentivo e amor.

A Frangos Macedo S.A., pelo apoio estrutural (material, instalações, assistência operacional e técnica) concedido para a execução da parte zootécnica deste trabalho.

A Edgar Cattelan e Rogério Maggioni pelo apoio, estímulo e colaboração.

Ao Curso de Pós-graduação em Agroecossistemas do Centro de Ciência Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade.

Aos professores e funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio.

Aos alunos de graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina: Álvaro, Cícero, Cristiano, Denise, Galvão, Maurício, Patrícia, Tovar e especialmente ao Leandro, Tânia e Zulmar pela colaboração.

Aos alunos de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina: Tatiana, Cristiane e Junior pela colaboração na etapa analítica.

Aos alunos de Pós-graduação em Agroecossistemas, em especial a Luiz Alexandre e Hermes.

Ao Leonardo e esposa pela colaboração no experimento zootécnico.

A Formil Química Ltda pelo fornecimento do probiótico Bioplus® 2B.

Ao Sr. Núncio da BioCamp Laboratórios Ltda pela disponibilização dos probióticos Colostrum® Avis e Simbiótico® Plus.

Ao Sr. José Messias da FATEC pelo fornecimento do Nitrovin e pela disponibilização de bibliografia.

A ELANCO pela disponibilização da Avilamicina®.

Ao Sr. César Lopes da PFIZER pelo fornecimento da Virginamicina®.

Aos membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. José Carlos Fiad Padilha, Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato, Prof. Dr. Renato Irgang e o Ms. Rogério Maggioni pelas sugestões e pela avaliação deste trabalho.

Ao CNPq e Curso de pós-graduação em Agroecossistemas pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

E a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. A IMPORTÂNCIA DA AVICULTURA INDUSTRIAL BRASILEIRA DE FRANGOS DE CORTE	14
2.2. CAMA DE AVIÁRIO	15
2.3. PROMOTORES DE CRESCIMENTO	16
2.3.1. VIRGINIAMICINA.....	17
2.3.2. AVILAMICINA.....	18
2.3.3. NITROVIN.....	18
2.3.4. OLAQUINDOX.....	19
2.4. RESISTÊNCIA MICROBIOLÓGICA.....	19
2.5. PROBIÓTICO	21
2.5.1. DEFINIÇÃO.....	21
2.5.2. HISTÓRICO.....	22
2.5.3. MICROBIOTA INTESTINAL.....	22
2.5.4. COMPOSIÇÃO E UTILIZAÇÃO.....	23
2.5.5. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO PARA UM PROBIÓTICO EFETIVO.....	24
2.5.6. MECANISMO DE AÇÃO.....	25
2.5.6.1. COMPETIÇÃO PELOS SÍTIOS DE ADESÃO OU LIGAÇÃO	25
2.5.6.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
2.5.6.3. NEUTRALIZAÇÃO DE ENTEROTOXINAS	26
2.5.6.4. ALTERAÇÕES DO METABOLISMO	26
2.5.6.5. AUMENTO DA IMUNIDADE.....	27
2.6. PREBIÓTICOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. ETAPA ZOOTÉCNICA.....	29
3.1.1. LOCAL E PERÍODO	29

3.1.2. ANIMAIS.....	29
3.1.3. INSTALAÇÃO E MANEJO.....	29
3.1.4. TRATAMENTOS.....	32
3.1.5. PARÂMETROS AVALIADOS.....	34
3.1.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
3.2. ETAPA ANALÍTICA.....	35
3.2.1. ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	35
3.2.1.1. INSTRUMENTAL UTILIZADO.....	35
3.2.1.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	35
3.2.1.3. DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	36
3.2.1.4. PROCEDIMENTOS.....	36
3.2.1.4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	36
3.2.1.4.2. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	37
3.2.1.4.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	37
3.2.1.4.4. CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES.....	39
3.2.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	39
3.2.2.1. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DO ENSAIO.....	39
3.2.2.2. RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	39
3.2.2.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DOS ANIMAIS.....	41
4.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROVIN E DE OLAQUINDOX NA CAMA DE AVIÁRIO.....	49
4.2.1. VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS.....	49
4.2.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROVIN NA CAMA DE AVIÁRIO.....	57
4.2.3. CONCENTRAÇÃO DE OLAQUINDOX NA CAMA DE AVIÁRIO.....	59
5. CONCLUSÕES.....	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	61
8. ANEXOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Fator de Produção de frangos de corte de 0 - 48 dias de idade para os 8 tratamentos avaliados.....	46
Figura 2 - Mortalidade de frangos de corte de 0 - 48 dias de idade para os 8 tratamentos avaliados.....	48
Figura 3 - Cromatogramas representativos obtidos por CLAE de amostras de cama de aviário.....	52
Figura 4 - Curvas de calibração obtidas na análise do nitrovin (<i>a</i>) e do olaquinox (<i>b</i>), em cama de aviário.....	53
Figura 5 – Evolução da degradação do nitrovin nas amostras de cama de aviário nos quatro períodos de compostagem para o tratamento 2 (40 ppm) e para o tratamento 4 (80 ppm).....	58

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Composição percentual e química das rações experimentais.....	31
Tabela 2 - Composição dos tratamentos experimentais.....	32
Tabela 3 – Médias (\pm Desvio Padrão) do Peso Vivo, Ganho de Peso, Consumo de Ração e Conversão Alimentar de frangos de corte no período de 0 - 21 dias de idades nos diferentes tratamentos (rações com e sem promotores de crescimento).....	42
Tabela 4 - Médias (\pm Desvio Padrão) do Peso Vivo, Ganho de Peso, Consumo de Ração e Conversão Alimentar de frangos de corte no período de 21- 48 dias de idade nos diferentes tratamentos (rações com e sem promotores de crescimento).....	43
Tabela 5 - Médias (\pm Desvio Padrão) do Peso Vivo, Ganho de Peso, Consumo de Ração e Conversão Alimentar de frangos de corte no período de 0- 48 dias de idade nos diferentes tratamentos (rações com e sem promotores de crescimento).....	44
Tabela 6 – Custo de produção por frango e por lote (18000 frangos) com base no consumo de ração (R\$ 300,00 por tonelada).....	45
Tabela 7 - Rendimentos de Carcaça, Peito, Coxa e Sobre-coxa, Coração e fígado de frangos de corte no período de 0 - 48 dias de idade, nos diferentes tratamentos (com e sem promotor de crescimento).....	47
Tabela 8 – Dados de precisão, exatidão e recuperação analítica para o nitrovin e o olaquinox obtidos por CLAE no intra-ensaio para validação das metodologias.....	55

Tabela 9 – Cálculos da precisão e exatidão para a análise do nitrovin e do olaquinox obtida por CLAE no **inter-ensaio** para a validação da metodologia..... 56

Tabela - 10 - Médias (\pm desvio padrão) das concentrações do nitrovin nas amostras de cama dos tratamentos 2 (40 ppm) e 4 (80 ppm) nos quatro períodos de compostagem..... 58

LISTA DAS ABREVIATURAS MAIS USADAS

- mV . s** – Micro volts x segundo
- A C N** – Acetonitrila
- C A** – Conversão alimentar
- C R** – Consumo de ração
- C V** – Coeficiente de variação.
- C L A E** – Cromatografia líquida de alta eficiência.
- D P** – Desvio padrão
- D M F** – Dimetilformamida
- EtOH** – Etanol
- F D A** – Food and Drug Administration (EUA)
- F O S** – Frutoligossacarídeos
- g** – Grama
- g** – Gravidade (força gravitacional)
- G P** – Ganho de peso
- K g** – Quilograma
- MeOH** – Metanol
- mohm.cm** – Mili Ohm x centímetro
- n** – Número de amostras
- N Q** – Não quantificável
- P V** – Peso vivo
- r** – Coeficiente de regressão linear
- T** – Tratamento
- T G I** – Trato gastrintestinal.

RESUMO

A avicultura industrial brasileira teve seu marco inicial na década de 60, trazendo consigo a utilização de antibióticos e outros quimioterápicos em larga escala. No início, essas substâncias foram utilizadas para prevenir enfermidades, mas com o passar do tempo, começaram a ser usadas também como promotores de crescimento. A partir da década de 80, pesquisadores começaram a notar que determinadas cepas bacterianas haviam se tornado resistentes aos antibióticos utilizados em aves e que o uso continuado de antimicrobianos, como promotores de crescimento, servia para expandir um "pool" de genes de resistência na natureza. Dentro desse contexto, começou a ser formado um novo conceito de aditivo, que poderia vir a substituir os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) na produção de frangos de corte. Esses aditivos receberam o nome de probióticos, que são compostos, a base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço da microbiota intestinal. Neste trabalho desenvolveu-se um experimento para avaliar os efeitos de promotores de crescimento (antimicrobianos e probióticos) na alimentação de frangos de corte e para investigar a ocorrência de resíduos de promotores de crescimento na cama de aviário, evidenciando o efeito do período de compostagem na degradação das substâncias analisadas. O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira usou-se frangos de corte, da linhagem COBB, até 48 dias de idade, submetidos a dietas com e sem suplementação, com diferentes promotores de crescimento (tratamentos). Foram alojados 2880 pintos de corte de um dia, em baias de 4m², distribuídos em 8 tratamentos, com 8 repetições de 45 aves cada. Além do consumo de ração, do ganho de peso, da conversão alimentar e da mortalidade foram analisados os rendimentos de carcaça, de cortes (coxa e sobrecoxa, peito) de vísceras (coração e fígado), fator de produção e custos. Não foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos para a grande maioria dos parâmetros avaliados. As aves que receberam probióticos apresentaram uma conversão alimentar pior em relação as que receberam os antimicrobianos. Na segunda etapa, após o experimento com as aves, assim como aos 60, 120 e 180 dias de compostagem, foram analisadas as amostras de cama de aviário que receberam ração aditivada com Nitrovin e Olaquinox,. As concentrações dessas substâncias foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase-reversa com detecção ultravioleta em 380 e 376 nm, respectivamente. As metodologias de CLAE adotadas neste trabalho foram de execução simples e econômica, suficientemente sensíveis, específicas e reprodutíveis. Foi encontrado resíduo de nitrovin nas amostras de cama de aviário nos quatro períodos de compostagem. O teor de nitrovin encontrado apresentou uma redução gradual ao longo do período de compostagem. Não se observou a presença de olaquinox em nenhum dos períodos analisados. Esses resultados com os promotores de crescimento (nitrovin e olaquinox), sugerem a necessidade de prudência e o uso da compostagem para a viabilização da cama de aviário como adubo orgânico.

ABSTRACT

In the beginning of the 80's decade, researchers noticed that some bacterial strains have become resistant to antibiotics used in poultry production. The continuous use of antimicrobials as growth promoters have expanded pools of genes of microbiological resistance in nature. Considering this, a new concept of additive was developed, which would replace the antimicrobials (antibiotics and chemotherapics) in the production of broiler chickens. These additives, called probiotics, are food supplements based on live microorganisms that benefit the host animal, promoting the balance of the intestinal microbiota. An experiment was developed to evaluate the effects of growth promoters (antimicrobials and probiotics) in the production of broilers to investigate the occurrence of residuals of growth promoters in the litter bedding, and to show the effect of litter compostage in the degradation of the substract. The experiment was divided in two parts. On part one, one day old chickens, from a COBB line, were raised up to 48 days of age. They were submitted to diets containing or not supplementary growth promoters in distinct treatments. On day one of age a total of 2880 chickens were placed in 4 m² pens, distributed in 8 treatments with 8 replicates (45 birds in each pen). Traits analyzed were feed consumption, weight gain, food conversion, mortality and the carcass cuts and viscera traits, production factors and costs. Significant differences between treatments were not observed in the majority of the traits. The birds that received probiotics showed a worse feeding conversion in relation to the birds that received antimicrobials. Part two of the experiment was started after the removal of the birds from the facilities. Samples of litter bedding, which received feed containing Nitrovin and Olaquinox were collected when the birds left the facilities, as well as at 60, 120 and 180 days of compostage. The concentrations of Nitrovin and Olaquinox were determined by reversed-phase High-Pressure Liquid Cromatography (HPLC) with ultraviolet detection (380 and 376 nm, respectively). Both HPLC methods were simple, economic, sensible, specific and easy to replicate. Residues of Nitrovin were found in the samples from the litter bedding in all 4 periods of compostage. Levels of Nitrovin gradually reduce along the period of compostage. It was not noticed the presence of Olaquinox in any of the analyzed period. These results suggest concern about the use of growth promoters (Nitrovin and Olaquinox) and suggest that care must be taken when manging of the compostage in order to improve the use of the litter bedding to fertilize soils.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira cresceu muito nos últimos anos, constituindo-se numa atividade de grande importância para a economia do país. Atualmente o Brasil ocupa a segunda posição no “ranking” mundial dos maiores produtores de frangos de corte. Essa produtividade se deve principalmente as grandes transformações ocorridas na avicultura nas últimas décadas, caracterizando-se hoje por seu alto grau de competitividade e avançados padrões tecnológicos.

As aves utilizadas na produção avícola nascem em incubatórios, nos quais se procura reduzir a contaminação em todas as fases do processo. A ausência de contato das aves com uma microbiota natural, logo após o seu nascimento, interfere no seu desenvolvimento intestinal e geral (SILVA, 2000). O efeito negativo deste processo tem sido contornado, em parte, com o uso de promotores de crescimento, são substâncias antimicrobianas (drogas antibióticas ou quimioterápicas) utilizadas de forma contínua na ração, em doses subterapêuticas. A indústria tem em geral um bom número de antimicrobianos com diferentes espectros de atividade, usando-os desde o primeiro dia de vida do frango até o abate, respeitando-se o período legal de retirada (MOTA, 1996). Os promotores de crescimento são conhecidos como melhoradores do desempenho, pois “modulam” a flora intestinal e melhoram a eficiência do animal. No entanto, é crescente a restrição, em todo o mundo, ao uso de antimicrobianos na forma terapêutica e como promotores de crescimento em animais destinados à produção de alimentos. É cada vez maior o aparecimento de cepas bacterianas, responsáveis por infecções avícolas, resistentes às drogas terapêuticas e conseqüentemente, menor a disponibilidade das mesmas para tratamentos sanitários (ZIGGERS & SLUIS, 1998). Nos Estados Unidos da América mais de 40% dos antibióticos produzidos são utilizados em níveis subterapêuticos nas rações animais. “Este uso subterapêutico é uma forma de promover a seleção de um número crescente de bactérias resistentes” (LEVY , 1998).

As indústrias fornecedoras de promotores de crescimento garantem que essas substâncias não são absorvidas pelas membranas das paredes intestinais do animal, sendo eliminadas através das fezes, onde são rapidamente biodegradadas; dessa maneira, não deixam resíduos no animal, não causam riscos a saúde humana e nem ao ambiente (MOTA, 1996; FEFANA, 1997).

No entanto, se a biodegradação do promotor de crescimento na cama do frango não ocorrer rapidamente, o risco de uma resistência microbiológica pode ser eminente. Essa preocupação tem levado profissionais da agricultura a tomar algumas medidas, entre as quais,

a de determinar, que a cama do frango só poderá ser usada como fertilizante orgânico depois de 180 dias da sua retirada do aviário (norma adotada pelos certificadores da agricultura orgânica). No ano de 2000, foram produzidas no Brasil cerca de 6,9 milhões de toneladas de cama de frango. Essa grande quantidade tem sido amplamente utilizada na agropecuária catarinense, principalmente na agricultura orgânica, exigindo portanto mais estudos, já que implica em riscos a saúde dos animais e do homem.

Muitas substâncias têm sido estudadas pelos pesquisadores como alternativas que possam vir a substituir o uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento, entre elas probióticos e prebióticos. O termo Probiótico foi proposto, pela primeira vez em 1965, atualmente, designa “suplemento alimentar composto de cultura pura ou composta de microorganismos vivos com a capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal, com ação de promotores de crescimento, beneficiando a saúde do hospedeiro pelo estímulo às propriedades existentes na microbiota natural” (SILVA, 2000). Os prebióticos são nutrientes, geralmente oligossacarídeos que auxiliam na multiplicação dos probióticos.

A alternativa de substituir os antimicrobianos pelos probióticos tem sido bem vista pelo consumidor mundial, principalmente o europeu, que tem pressionado o mercado de várias maneiras. Essa pressão se reflete em mudanças na produção, principalmente no Brasil que exporta grande parte do que produz. Somado a este fato, o receio de estar exposto a resíduos de antibióticos e outros quimioterápicos largamente empregados no confinamento tem levado o consumidor brasileiro gradativamente, a buscar no mercado produtos que lhe tragam menos riscos à saúde. Ele não tem demonstrado o mesmo nível de conscientização e preocupação do consumidor europeu, que ao comprar um produto, leva, muitas vezes, em conta a forma como foi produzido (bem estar animal, impactos ambientais, etc) e se traz riscos à saúde humana. Contudo, é uma conscientização em formação e um mercado que está crescendo. É neste contexto que os probióticos mereceram atenção especial de nossa parte como uma possível alternativa de substituição ao uso dos tradicionais promotores de crescimento, uma vez que não determinam resíduos nos produtos de origem animal e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos (ANDREATTI & SAMPAIO, 2000).

Este trabalho teve como objetivo buscar subsídios teóricos, através de uma revisão bibliográfica sobre a problemática do uso de promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte; apresentar o uso de alguns probióticos como alternativa de substituição aos atuais promotores de crescimento, através da condução de um trabalho experimental com frangos de corte e da discussão de seus resultados, além de investigar a ocorrência de resíduos

de promotores de crescimento antimicrobianos na cama de aviário, evidenciando o efeito do período da compostagem na degradação das substâncias analisadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A IMPORTÂNCIA DA AVICULTURA INDUSTRIAL BRASILEIRA DE FRANGOS DE CORTE

A avicultura brasileira tem crescido muito nos últimos dez anos. Atualmente o Brasil ocupa a segunda posição no “ranking” mundial dos maiores produtores de frangos de corte, sendo superado apenas pelos Estados Unidos da América. No entanto, a evolução da produção brasileira não tem apresentado os mesmos índices de desenvolvimento para todas as regiões geográficas. A região Centro-Oeste passou de uma produção de 6,8% em 1998 para 7,9% em 2001. Essa região tem sido alvo de grandes expectativas do setor avícola, pois tem apresentado os menores preços de milho e soja em relação todas as outras regiões brasileiras, uma vez que é uma grande produtora desses grãos, principais ingredientes da alimentação das aves (60% a 70% do custo total da ração). A região Norte manteve-se abaixo dos 15%, e a região Nordeste em 8,7%, enquanto que a região Sudeste teve um decréscimo de 3,8%, saindo dos 31,0% em 1998 para 27,2% em 2001. O Sul do Brasil foi pioneiro na produção e tem aumentado continuamente sua participação. Os três estados do sul são responsáveis por mais de 50% da produção de frangos no Brasil. No decorrer dos últimos quatro anos esta região apresentou um acréscimo de 3% no alojamento de pintos, partindo de uma participação de 52,4% em 1997 para 55,2% em 2001, considerando os períodos de setembro a setembro de cada ano. O estado de Santa Catarina durante anos figurou na liderança do ranking, porém no ano de 1999 sua produção foi superada pelo estado do Paraná (TALAMINI, 2002). Em 2000 os dois estados fecharam o ano quase empatados em participação: respectivamente, 18,95% e 18,7% da produção nacional de 3,254 bilhões de cabeças (MACHADO, 2002a). Essa grande produtividade pode ser explicada e sustentada por seu pioneirismo, pela tradição dos criadores, por sua estrutura de pequenas propriedades familiares, pelas agroindústrias já instaladas e pelo crescimento dos mercados interno e externo.

No Brasil, no ano de 2000, foram consumidas mais de cinco milhões de toneladas de carne de frango. O consumo interno “Per Capta” de carne de frango aumentou de 23,8Kg por habitante em 1997 para 31Kg em 2001 (TALAMINI, 2002). Esse aumento pode ser atribuído a vários fatores, entre eles, a qualidade, a imagem do produto saudável e os preços acessíveis. O aumento de consumo estimulou o crescimento de mercado que gerou em 2001 mais de 2,4 milhões de empregos diretos e indiretos no setor avícola do Brasil.

O mercado consumidor externo também vem crescendo ano após ano. Em 2000 o Brasil embarcou 916 mil toneladas de frango. Em setembro de 2001 já tinha exportado 921,3 mil toneladas de frango, um crescimento de 0,57% desse período em relação ao ano de 2000. O aumento médio de 20% no preço da tonelada, de US\$ 889 para US\$ 1.078, favoreceu o salto de 61,9% no volume financeiro, que atingiu US\$ 993,1 milhões em agosto de 2001 (MACHADO, 2002b). Nesses últimos anos, alguns mercados foram perdidos como o dos países do Mercosul, outros foram mantidos como o da Ásia, no entanto, mercados como os da União Européia, África e Rússia foram conquistados. O somatório do crescimento dos volumes absorvidos por outros países também foi importante no resultado final das exportações. Um fator que contribuiu muito para impulsionar as exportações brasileiras foi o comportamento do dólar durante o ano de 2001. A valorização do dólar perante o real, tornou os produtos brasileiros bastante atrativos ao mercado externo. Outros fatores que favoreceram as exportações brasileiras foram a maior demanda por parte da União Européia, depois do agravamento dos problemas sanitários, como o mal da vaca louca e a febre aftosa, e o aumento da oferta de milho no mercado interno em 2001, que permitiu diminuir os custos de produção (D'ÁVILA, 2002). Entretanto, para garantir o crescimento desses mercados, e/ou conquistar outros, é muito importante e indispensável ter garantido o apoio governamental nas negociações internacionais e nos instrumentos oficiais de inspeção sanitária, bem como, ter uma política cambial adequada e apresentar um produto de qualidade com preços competitivos. O setor precisa apresentar uma política agrícola adequada em termos de suporte à produção, armazenamento e comercialização do produto e insumos, e possuir uma boa coordenação entre os diversos elos da cadeia produtiva e dos agentes econômicos governamentais e privados.

2.2. CAMA DE AVIÁRIO

A cama de aviário, também é conhecida popularmente por “cama de frango”. Em sua composição, encontramos além do material absorvente usado como cama (daí seu nome) e da excreta das aves, uma menor quantidade de outros materiais, como ração, penas, materiais do piso do aviário, etc. O material absorvente é bastante variável sendo mais comum a serragem de madeira. Essa diversidade causa uma grande heterogeneidade em sua composição e, somado a isso, o tipo de ração, a idade e o tipo de aves, a quantidade de penas excretada, o número de lotes criados, o tempo e a forma de armazenamento da cama, também concorrem para torná-la um grande adubo utilizado na agricultura (EL BOUSHY, VAN DER POEL,

1994). Só no ano de 2000 foram produzidos no Brasil cerca de 6,9 milhões de toneladas de cama de aviário. Uma quantidade considerável e de grande importância nutricional para o solo, pois a cama possui um teor de nitrogênio suficiente para fertilizar grande parte das áreas de cultivo de cereais conduzidas nas proximidades dos aviários, a um nível de aplicação de 90 Kg/N/ha. O nível de fósforo e potássio contido nesse adubo é mais do que suficiente para suprir as necessidades de cereais como o milho (LEME et al., 2000). Além é utilizado como fertilizante orgânico, para a aplicação em sulcos em cultivos hortícolas, de fruteiras, florestas e como componente orgânico para a composição de solo destinado a jardinagem. Apesar da qualidade nutricional para o solo, a cama de aviário tem sofrido restrições de uso nos últimos anos, principalmente por parte da agricultura orgânica. A preocupação em torno dos aditivos utilizados na alimentação de aves, levou os certificadores de agricultura orgânica a exigir um período de 180 dias de compostagem da cama depois de retirada do aviário. Esse período foi estabelecido para que possa ocorrer através do processo de compostagem, a biodegradação dos aditivos utilizados na ração. No entanto, o que se conhece a respeito da cama de aviário ainda não é suficiente para esclarecer todas as dúvidas sobre sua eficácia como adubo, sendo necessário estudá-la melhor para poder recomendar seu uso com maior segurança.

2.3. PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Os promotores de crescimento antimicrobianos usados na criação animal são constituídos por antibióticos ou quimioterápicos. Os primeiros, são substâncias sintetizadas por fungos, bactérias ou actinomicetos, e os segundos, são substâncias produzidas sinteticamente em laboratórios (RANG et al., 2001). Os antibióticos foram aprovados em 1951, pela Food and Drug Administration (FDA), como aditivo para a alimentação de animais de fazenda e tiveram seu uso rapidamente estabelecido como subterapêutico para prevenir a ocorrência de doenças causadas por bactérias e promover o crescimento animal (CASEWELL, 1998). Os promotores de crescimento podem ser conceituados como sendo melhoradores de crescimento, pois “modulam a flora intestinal e melhoram a eficiência do animal“. Atualmente, os benefícios destes antimicrobianos são conhecidos, porém seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados. Algumas teorias tem sido propostas, entre elas, a prevenção de infecções subclínicas; a redução de produção de substâncias tóxicas produzidas pela microbiota intestinal, como por exemplo, a redução de amônia; o controle do tamanho da parede do intestino delgado favorecendo a absorção e o

aproveitamento de nutrientes, diminuindo o volume de fezes excretadas (“efeito poupador”) e melhorando os índices de conversão alimentar. Os promotores de crescimento apresentam entre outras características, a de influenciar na microbiota intestinal, limitando o crescimento de certas populações, devendo ser usados em doses muito pequenas num intervalo entre 5 e 100 ppm; não devem “limpar” nem “esterilizar” o trato gastrointestinal, pois os microorganismos benéficos participam no desdobramento e na absorção de nutrientes, além de criar um ambiente desfavorável para a população de microorganismos prejudiciais; não devem ser absorvidos, tendo que ser eliminados através das fezes, onde devem ser rapidamente biodegradados, evitando assim, riscos à saúde do homem e ao ambiente (MOTA, 1996; FEFANA, 1997).

Se a degradação do promotor de crescimento na cama avícola não ocorrer rapidamente, o risco de uma resistência microbiológica pode ser iminente. O risco de resistência é uma hipótese que tem levado produtores e cientistas, de um lado, e consumidores de outro, a se confrontarem em contínuas discussões. Os primeiros usam argumentos científicos na defesa do uso de tais substâncias, que garantem benefícios econômicos. Os últimos usam argumentos geralmente contaminados pela emoção, como o caso dos consumidores europeus que ainda temem pelos escândalos recentes envolvendo os alimentos, como o caso da crise da salmonela, do pânico da “vacca louca”, da catástrofe da dioxina e da preocupação com os alimentos geneticamente modificados. Na esperança de reduzir a disseminação da resistência de antibióticos na Europa, muitos países europeus tem banido o uso de antibióticos e de quimioterápicos na alimentação animal. Nos EUA, no Brasil e em muitos países, grandes quantidades dessas substâncias continuam a ser usadas, principalmente, na alimentação de frangos de corte e de suínos (PARKER et al., 1994). Muitos são os antimicrobianos usados como promotores de crescimento. Quatro deles foram utilizados nos estudos experimentais deste trabalho: Virginiamicina, Avilamicina, Nitrovin e Olaquinox.

2.3.1. VIRGINIAMICINA

Virginiamicina é um promotor de crescimento produzido por *Streptomyces virginiae*, isolado pela primeira vez de solo belga. Possui na sua composição dois componentes principais: Fator M e Fator S. O Fator M é um componente que apresenta atividade antimicrobiana para o *Micrococcus aureus*, enquanto o Fator S apresenta atividade contra o *Bacillus subtilis*. Contudo, a interação sinérgica desses dois componentes faz da

virginiamicina um antibiótico de ampla atividade contra microorganismos gram positivos, entre eles, *Stapylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium welchii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium xerosis*. A virginiamicina é estável por três anos em condições de baixa umidade e temperatura ambiente. Não é degradada no processo de peletização da ração e pode permanecer estável na ração por até 3 meses. É rapidamente metabolizada e excretada pelo animal, não necessitando do período de retirada da ração antes do abate (KLINE, 1991).

2.3.2. AVILAMICINA

Avilamicina (C₆₁H₈₈Cl₂O₃₂) é o nome genérico do antibiótico oligossacarídeo do grupo orthosomicina, produzido pela fermentação de *Streptomyces viridochromogenes*. Possui ação antibacteriana para várias espécies de bactérias gram positivas e negativas, entre elas, *Lactobacillus cereus*, *Clostridium prefringens*, *Corinebacterium bovis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella cholerae suis* e *Treponema hyodysenteriae*. É rapidamente metabolizada e excretada pelo animal, não necessitando do período de retirada da ração antes do abate (CEREZO et al. , 1991).

2.3.3. NITROVIN

Nitrovin [1,5-bis(5-nitro-2-furyl)penta-1,4-dien-3-one aminohydrazone hydrochloride] é uma substância derivada do nitrofurano, comercializado com o nome de Panazon (Japão), Peson, Orphazone e Payzone. Sua ação microbiana *in vitro* inibe ou destrói algumas bactérias, a maioria não patogênica. *In vivo*, nitrovin inibe somente o *Clostridium welchii* e promove o aumento do número de bactérias coliformes estimulantes do crescimento e de lactobacilus heterofermentativos no intestino delgado do frango, estimulando a formação de vitaminas, facilitando com isso, o crescimento do animal. Seu mecanismo de ação não está muito bem elucidado, mas como sua ação antimicrobiana é baixa, supõe-se que seu modo de ação se deve provavelmente a seu efeito sobre o processo digestivo, com ação especial sobre o metabolismo proteico. Somente uma pequena fração do nitrovin ingerido pelo animal é absorvida por ele, o restante é eliminado, principalmente pelas fezes. As bactérias *Staphylococcus aureus* e os lactobacilos podem adquirir resistência ao nitrovin. Em experimentos *in vitro* se observou que a resistência de *Staphylococcus aureus* era transferível e que algumas cepas de *Staphylococcus aureus* eram resistentes a furazolidona e a outros nitrofuranos. Em experimentos *in vivo* não se observou a transferência de resistência

(KOSTER, 1973). Assim como a virginiamicina, o nitrovin e a avilamicina são estáveis por três anos em condições de baixa umidade e temperatura ambiente. Não são degradados no processo de peletização da ração e nela podem permanecer estáveis por três meses (Kline, 1991).

2.3.4. OLAQUINDOX

Olaquinox [2-(N-2-hydroxyethylcarbamoil)-3-methylquinoxaline-1,4 dioxide] é uma substância usada como promotor de crescimento na alimentação de animais de fazenda. Possui ação antibacteriana para várias espécies de bactérias, porém seu espectro é mais efetivo para as bactérias gram negativas, entre elas, *Clostridium prefringens*, *Corinebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus haemolyticus*. Somente uma pequena fração do Olaquinox ingerido pelo animal é absorvida por ele, o restante é eliminado nas fezes. O olaquinox é estável por dois anos desde que esteja protegido da luz em condições de baixa umidade, e temperatura ambiente (CEREZO et al. , 1991). É uma substância potencialmente carcinogênica (BIANCOTTO et al., 1996), por isso é muito importante a questão residual desta substância em tecidos animais de consumo humano, além dos cuidados com seu manuseio, principalmente na elaboração das rações.

2.4. RESISTÊNCIA MICROBIOLÓGICA

O problema do uso de baixos níveis de antimicrobianos na alimentação animal é que uma microbiota resistente pode ser selecionada pela sua constante exposição a estes antimicrobianos. O uso de antimicrobianos na alimentação animal, pode portanto, levar à expansão de um “pool” de genes de resistência a antimicrobianos na natureza. Existem dois tipos de resistência: a cromossomal e a transferível.

A resistência cromossômica, se desenvolve através da mutação do material genético cromossomal. Esse tipo de resistência só é transmitida para organismos da mesma espécie, através do processo de divisão celular, não sendo transmitida para organismos de espécies diferentes. A rapidez e a extensão do desenvolvimento deste tipo de resistência varia de antibiótico para antimicrobiano. Para a streptomina, por exemplo, um microorganismo pode tornar-se altamente resistente em apenas algumas horas, para a erytromicina em poucos dias e para outros tipos de antibióticos esse processo pode ser mais lento.

A resistência transferível, foi reconhecida em organismos entéricos nos anos cinquenta por pesquisadores japoneses. A resistência transferível resulta da presença de um elemento genético, o Fator R, encontrado no citoplasma das bactérias. Um único Fator R, pode transportar, simultaneamente, a resistência de um ou vários tipos de antibióticos. Assim, no caso de resistência múltipla a drogas, o uso de um único antibiótico pode selecionar microorganismos resistentes a vários outros tipos de antibióticos (KLINE, 1991). Esse tipo de resistência tem sido estudada na flora do intestino humano. Os resultados tem demonstrado que as cepas de bactérias de múltipla resistência são encontradas, principalmente, em pessoas que trabalham na criação animal (SOUZA, 1998). Como o nome sugere, este tipo de resistência pode ser transferida de uma célula bacteriana para outra. Essa transferência pode se dar através do processo de conjugação, transformação e/ou transdução. A ocorrência de transferência de resistência tem sido demonstrada em muitos gêneros de bactérias gram negativas e positivas, porém as mais conhecidas são do tipo gram negativa, como, *Shigella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* e *Aeromonas* (KLINE, 1991).

Experimentos feitos com cepas resistentes de isolados de *Salmonella* para frango de corte demonstraram que os determinantes de resistência residem na conjugação de plasmídeos ou transposons (estruturas presentes no DNA da bactéria) e que os determinantes de resistência eram rapidamente transferidos entre espécies diferentes e mesmo entre gêneros diferentes. Sendo assim, organismos resistentes podem então ser transmitido do animal para o homem através de carne contaminada, pelo contato com o animal vivo (PARKER et al., 1994) e pelo contato com algum subproduto do meio onde o animal foi criado.

Pesquisas desenvolvidas utilizando animais alimentados com rações suplementadas com e sem antibióticos, tem demonstrado que as bactérias resistentes aos antibióticos não são rapidamente eliminadas do intestino. Este é um postulado onde os genes de resistência tem se tornado parte de plasmídeos estáveis na flora intestinal e que os determinantes de resistência, mesmo na ausência de forças “contra-seletivas”, tem se mantido e permanecido em uma parte da microbiota intestinal do animal por algum tempo, mesmo parando a suplementação de rações com antibióticos (PARKER et al., 1994).

2.5. PROBIÓTICO

2.5.1. DEFINIÇÃO

Ao longo dos anos a palavra probiótico vem sendo usada de diversas maneiras. Ela foi usada originalmente para descrever substâncias produzidas por protozoários que estimulavam o crescimento de outros microorganismos (LILLY & STILLWEL, 1965). ATHERTON & ROBBINS (1987) conceituaram probiótico como qualquer produto que pudesse ajudar a flora normal a manter seu domínio sobre organismos patogênicos. O caráter vago desses conceitos pode ter sido influenciado pelas dúvidas que existiam naquele período, tais como se os microorganismos probióticos deveriam ser veiculados vivos ou não. No entanto, o termo, como significado mais próximo do atualmente empregado, já havia sido definido por PARKER (1974) na década de setenta como sendo um suplemento microbiano capaz de exercer um efeito benéfico sobre a microbiota intestinal do hospedeiro. De forma geral, esse termo foi definido como sendo, *organismos ou substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal*. Esta definição por ser imprecisa, não é totalmente satisfatória, já que permite a inclusão dos antibióticos nesse conceito. Desse modo, a melhor definição para probióticos seria: um “suplemento alimentar microbiano vivo, capaz de afetar benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da sua microbiota intestinal” (FULLER, 1989).

O FDA dos EUA define probiótico como uma fonte de microorganismos vivos viáveis que ocorrem naturalmente, os quais podem ser utilizados diretamente na ração animal (DFM: direct-fed-microbial). SILVA (2000), definiu probiótico como um suplemento alimentar, composto de cultura pura ou composta, de microorganismos vivos, com capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal, com ação de promotor de crescimento, beneficiando a saúde do hospedeiro pelo estímulo às propriedades existentes na microbiota natural. O acúmulo de informações sobre a composição da microbiota intestinal do homem e dos animais, o efeito dos antimicrobianos sobre essa microbiota e as funções que os microorganismos probióticos podem exercer mantendo o equilíbrio desse ecossistema, exigem uma conceituação mais precisa para esse termo. *Probióticos são, portanto, produtos que carregam, na forma viável, microorganismos de origem intestinal humana, quando o produto se destina ao consumo humano, e de origem intestinal animal específica, quando se destina ao consumo de uma determinada espécie animal, com finalidade básica de restaurar ou manter o equilíbrio microbiano intestinal* (FERREIRA, 1998). Nada impede, no entanto, que os probióticos possam ser empregados com finalidades mais específicas, de acordo com evidências experimentais.

2.5.2. HISTÓRICO

A história desses aditivos é conhecida há centenas de anos, mas somente no início do século passado foi estudada racionalmente e pesquisada com bases científicas. O uso de organismos probióticos surgiu no Oriente Médio, onde os médicos prescreviam iogurtes e outros leites fermentados como terapêutica para afecções gastrointestinais e também como estimulante do apetite. A primeira informação sobre leites fermentados, influenciando a saúde humana, foi publicada por METCHNIKOFF (1907), pesquisador do Instituto Pasteur de Paris, após observar a longividade de camponeses búlgaros e atribuir o fato à dieta constituída basicamente de leite fermentado. Pesquisando os componentes do leite, Metchnikoff isolou o *Bacillus bulgaricus*, identificando depois como *Lactobacillus bulgaricus*. No seu livro “The prolongacion of life”, ele especulou que microorganismos nocivos ao aparelho intestinal expõem substâncias prejudiciais ao hospedeiro. Então por ingestão de alimentos benéficos, no caso o leite fermentado, pode-se melhorar o ambiente intestinal (hoje referida como manipulação microbiana), fortalecendo a saúde e aumentando a expectativa de vida do indivíduo.

LILLY & STILLWEL (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, verificando a ação de microorganismos como promotores de crescimento.

O marco do uso de probióticos em aves foi dado por pesquisadores finlandeses (NURNI & RANTALA, 1973). Em seus experimentos, observaram que o conteúdo intestinal de aves adultas normais, administrados oralmente às aves com um dia de idade, alterava sua sensibilidade à infecção causada por *Salmonella spp.*, prevenindo o estabelecimento desta no intestino. Esta idéia foi conceituada como “Exclusão Competitiva”, tornando-se conhecida como “conceito de Nurni”.

2.5.3. MICROBIOTA INTESTINAL

O feto no útero é estéril, mas assim que passa através da genitália feminina durante o nascimento é rapidamente contaminado por microorganismos. Assim, o recém-nascido adquire uma microbiota intestinal que é característica de sua espécie. No estado selvagem, o animal forma sua microbiota intestinal a partir do ambiente contaminado com bactérias da mãe. Esta microbiota, uma vez estabilizada no intestino, forma um sistema complexo e dinâmico, constituído de aproximadamente 400 espécies de bactérias em equilíbrio entre si e com o hospedeiro, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos,

fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (GEDEK, 1986; FULLER, 1992). Entre os principais gêneros de bactérias identificados na microbiota cecal das aves, observam-se invariavelmente a presença de *Bacillus*, *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Serratia*, *Veillonella* e *Streptococcus*, entre outros (ANDREATTI & SAMPAIO, 2000).

As bactérias que habitam o trato intestinal podem estabelecer-se de duas formas: em profunda associação com epitélio intestinal ou livre na luz intestinal, mas se multiplicando mais rapidamente do que sua eliminação pelo peristaltismo intestinal. Estes são os mecanismos que ocorrem, por exemplo, com algumas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus*, respectivamente. Outras espécies bacterianas não apresentam capacidade de aderir-se ao epitélio intestinal, assim como tampouco multiplicam-se em tempo que compense a eliminação pelo peristaltismo, mas permanecem no intestino se agregando a outras bactérias, que por sua vez estão aderidas à mucosa entérica (GUSILIS et al., 1999).

Fatores que levem ao desequilíbrio da microbiota intestinal, como o uso indevido de antimicrobianos e estresse de qualquer natureza do hospedeiro, podem permitir a instalação e a multiplicação de microorganismos patogênicos. Logo, fica evidente que o equilíbrio da microbiota intestinal, reflete diretamente um bom estado de saúde do hospedeiro (FULLER & GIBSON, 1995).

2.5.4. COMPOSIÇÃO E UTILIZAÇÃO

Os probióticos podem conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas. Quando as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e subcultivadas e/ou liofilizadas, algumas das suas propriedades são perdidas. Por outro lado, não se conhece, ainda, nem a composição total, nem a perfeita combinação entre as que melhor estimulam as propriedades probióticas ‘in vivo’. Estas são as razões pelas quais os produtos com culturas não definidas, ou fezes frescas, têm melhor ação probiótica do que as culturas definidas. Há probióticos com diferentes composições de microorganismos e mesmo aqueles pertencentes a mesma espécie, podem ter cepas diferentes. A eficácia do produto é estritamente dependente da quantidade e das características das cepas do microorganismo utilizado na elaboração do produto a ser

utilizado como aditivo alimentar. Portanto, é importante que se analise os probióticos como produtos separados, da mesma maneira como é feito com os antibióticos (LODDI, 2002).

As espécies animais para as quais existem produtos comerciais disponíveis são: aves, suínos, bovinos, ovinos, equinos, cães e gatos. As espécies de bactérias mais comuns utilizadas no preparo dos probióticos são: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. johonsii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium spp*, *Bacillus subtilis* e *B. toyoi*. É importante que as bactérias sejam hospedeiro-específicas para que a máxima eficácia do probiótico seja atingida (BUTOLO, 2001). Os probióticos podem ser aplicados de várias formas: adicionados nas rações; na água de beber; na pulverização sobre os animais; em cápsulas gelatinosas; inoculados em ovos de aves embrionados e na cama usada de aves.

2.5.5. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO PARA UM PROBIÓTICO EFETIVO

Vários pontos devem ser considerados na seleção e produção de microorganismos a serem usados como probióticos (SIMON & GORBBACH, 1984; JONES & TOMAS, 1987; FULLER, 1989; SISSONS, 1989; VANBELLE et al., 1990; STROMBECK & GUILFORD, 1991; MONTES & PUGH, 1993; NOUSIAINEN & SETÄLÄ, 1993; SALMINEN et al., 1993; FERNANDES, 1995; SILVA, 2000):

- Devem ser habitantes naturais do tratogastrointestinal (TGI) de animais saudáveis e espécie-específicos. As estirpes adequadas para aves, por exemplo, podem não ter a mesma eficiência em outras espécies;
- Devem ser capazes de produzir culturas viáveis em concentrações efetivas. Embora as medidas de concentração não sejam ainda precisamente conhecidas, estima-se que devam ser por volta de 10^6 e 10^7 UFC/ml para *Lactobacillus* e bactérias bífidas, respectivamente. Os microorganismos devem ser cultivados num ambiente muito semelhante ao que serão introduzidos, do contrário seu tempo de crescimento pode ser prolongado e eles podem não conseguir se multiplicar e colonizar o intestino;
- Devem possuir bactérias capazes de serem ativadas e multiplicadas rapidamente, após a ingestão do produto, com o intuito de inibir patógenos e proporcionar condições de resistência ao peristaltismo;
- As estirpes selecionadas devem ser tolerantes a enzimas salivares, ácidos estomacais, sais biliares do intestino delgado e ácidos orgânicos voláteis do intestino grosso;

- Devem ser capazes de se aderir às células epiteliais do intestino e excretar fator anti-*E. coli*;
- Não podem ser patogênicos ou capazes de produzir efeitos adversos no hospedeiro;
- Devem ser estáveis e precisam manter a viabilidade por longos períodos quando estocados;
- Devem resistir aos antimicrobianos e as altas temperaturas do processamento e
- Devem ser capazes de produzir culturas viáveis e de eficiência comprovada no animal em questão. A mistura de diferentes microorganismos é mais segura do que uma única espécie ou estirpe no produto comercial.

2.5.6. MECANISMO DE AÇÃO

O mecanismo ou os mecanismos de ação dos probióticos não estão completamente elucidados. Existem alguns modos de ação propostos para os probióticos “na sua atividade contra microorganismos patogênicos, aumentando a resistência do hospedeiro às desordens gastrointestinais” (FOX, 1998; FULLER, 1989; SISSONS, 1989; PORUBCAN, 1990; MONTES & PUGH, 1993; JIN et al., 1997; SILVA, 2000). As seguintes hipóteses são cogitadas como possíveis mecanismos de ação:

2.5.6.1. COMPETIÇÃO PELOS SÍTIOS DE ADESÃO OU LIGAÇÃO

Este conceito ficou também conhecido com o nome de “Exclusão Competitiva”, descrita por Esko Nurmi em 1973, na Finlândia. As bactérias probióticas ocupam sítios de ligação (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas. São necessárias 40 bactérias para recobrir a superfície de uma célula intestinal. Assim, as bactérias patogênicas seriam excluídas por competição. Certas espécies de bactérias produtoras de ácido láctico competem com coliformes por sítios de aderência intestinais (SISSONS, 1989). Estudo conduzido na França com espécies de *Bifidobacterium* verificou-se que, a propriedade de competir pelos sítios de adesão é dependente do número de bactérias viáveis que chegam ao local a ser colonizado e do tipo de receptor específico para a bactéria (VANBELLE, 1990). Além disso acredita-se na existência de interações entre alguns dos metabólitos produzidos pelas espécies probióticas. Algumas espécies de *Bifidobacterium* têm afinidade de ligação pelos receptores β -glucosamina que são os mesmos sítios de ligação de algumas espécies de *E. coli* enteropatogênicas. Desse modo a espécie da competição por sítios de adesão pode ser comprovada em alguns casos específicos.

2.5.6.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A produção de ácido láctico e acético pelas bactérias utilizadas como probióticos reduz o pH do ambiente do trato gastrointestinal (TGI), prevenindo o crescimento de vários patógenos, inclusive coliformes e permitindo o desenvolvimento de certas espécies de *Lactobacillus* (KLAENHAMMER, 1982; ATHERTON & ROBBINS, 1987). Outras substâncias microbianas como bacteriocinas, nisina, acidofilina, lactalina, peróxido de hidrogênio e toxinas letais para certos patógenos, também são produzidas por microorganismos de ação probiótica (VANBELLE et al., 1990). As bacteriocinas são substâncias antibióticas de ação local, que inibem o crescimento de patógenos intestinais. As bactérias ácido lácticas produzem nisina, diplococcina, lactocidina, bulgaricina e reuterina. Estas substâncias apresentam atividade inibitória tanto para bactérias gram-negativas quanto para gram-positivas, como a *Salmonella spp.*, *E. coli* e *Staphylococcus spp.* As bactérias intestinais, utilizando-se de ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro (prebióticos) produzem alguns ácidos orgânicos, como o propiônico, o acético, o butírico e o láctico, além do peróxido de hidrogênio, cujos espectros de ação incluem também a inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Aparentemente a ação bacteriostática dos ácidos graxos é dependente do pH, pois quanto maior a redução deste, maior a quantidade de ácido e efeito antibacteriano mais intenso. Não deve ser descartada a idéia de que todas estas substâncias antibacterianas podem atuar em associação, não só entre si como fatores desencadeantes e processantes, mas também como bloqueio físico. Algumas bactérias secretam enzimas como a β -glucuronidase e hidrolases de sais biliares que liberam compostos como ácidos biliares com ação inibitória sobre as outras bactérias (JIN et al., 1997).

2.5.6.3. NEUTRALIZAÇÃO DE ENTEROTOXINAS

Certos microorganismos produzem metabólitos que são capazes de neutralizar os efeitos de enterotoxinas produzidas por coliformes (SISSONS, 1989) e ainda reduzem a absorção de substâncias tóxicas como, por exemplo, da amônia (VANBELLE et al., 1990). Os probióticos que contém *Bifidobacterium* previnem a formação de aminas tóxicas pelas bactérias intestinais (STEWART & CHESSON, 1993).

2.5.6.4. ALTERAÇÕES DO METABOLISMO

Alguns probióticos podem atuar pelo aumento da atividade enzimática: como da β -galactosidase, modulando os efeitos de indivíduos lactase-deficientes, ou pela diminuição da

atividade enzimática como a da β -glucuronidase, da nitrorredutase e da azurreductase, responsáveis pela produção de substâncias pré-cancerígenas (SISSONS, 1989; VANBELLE et al., 1990). STEWART & CHESSON (1993) relatam que os probióticos parecem possuir uma ação anticancerígena.

2.5.6.5. AUMENTO DA IMUNIDADE

Nos recém-nascidos a imunidade é o resultado da exposição intestinal a uma variedade de antígenos, tais como bactérias patogênicas e proteínas dietéticas, o que é importante na defesa dos animais jovens contra diarreia (PORTER et al., 1987; SISSONS, 1989). As bactérias produtoras de ácido lático aumentam a atividade de macrófagos e linfócitos (SISSONS, 1989) e ainda podem estimular o sistema imunológico por meio da produção de vitaminas e do aumento da capacidade das células das microvilosidades de absorverem lactose, sacarose e maltose, não deixando esses açúcares disponíveis para o crescimento de patógenos (SILVA, 2000).

2.6. PREBIÓTICOS

Prebióticos são ingredientes não digeríveis da dieta alimentar que afetam benéficamente o organismo animal, pelo estímulo seletivo ao crescimento e/ou a atividade de um grupo limitado de microorganismos no cólon intestinal, podendo melhorar a saúde do hospedeiro (GIBSON & ROBERFROID, 1996). O conceito de substâncias prebióticas é relativamente recente. Na década de 80, YAZAWA & TAMURA (1982) indicaram a importância da ingestão de carboidratos não digeríveis no aumento de bifidobactérias e sugeriram que os frutoligosacarídeos (FOS) como sendo efetivos na melhoria da microbiota intestinal. O consumo de FOS resultou na supressão de substâncias putrefeitas e na diminuição da incidência de constipação.

As substâncias prebióticas mais conhecidas são: FOS, “neosugars”, inulinas, lactulose, lactitol e transgalactosídeos (TOS). Atualmente os prebióticos de maior interesse são aqueles que objetivam estimular bifidobactérias residentes no cólon intestinal. A estratégia de equilibrar a microbiota nessa área do intestino resultou do acúmulo de informações que propiciaram um melhor entendimento da regulação da microbiota intestinal nas diversas espécies. Em resumo, a microbiota do intestino delgado é instável mas permite alterações. Já o cólon intestinal apresenta uma microbiota mais estável, porém extremamente sensível aos antimicrobianos e de difícil reposição por via exógena, desbalanceando-se com facilidade.

Os seguintes critérios permitem a classificação das substâncias como prebióticos (ANDREATTI & SAMPAIO, 2000):

- Não podem ser hidrolisadas ou absorvidas nas porções iniciais do TGI;
- Devem sofrer fermentação seletiva por um limitado número de bactérias potencialmente benéficas no cólon intestinal;
- Deverão induzir preferencialmente, efeitos sistêmicos benéficos à saúde do hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em duas etapas: uma experimental, com os animais, que denominamos zootécnica e a outra, a analítica, com cama de aviário. A primeira, foi desenvolvida com frangos de corte em uma granja experimental avícola e a segunda, com cama de aviário, desenvolvida no Laboratório de Farmacocinética da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC e no Laboratório de Uso Comum do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

3.1. ETAPA ZOOTÉCNICA

3.1.1. LOCAL E PERÍODO

A etapa zootécnica foi conduzida na granja experimental da empresa Frangos Macedo S. A. no município de São José – SC a 20 km do centro de Florianópolis. Esta etapa ocorreu no ano de 2001, iniciando-se no mês de fevereiro com preparo dos galpões experimentais e terminando no mês de abril com o abate dos frangos e a coleta das amostras.

3.1.2. ANIMAIS

Foram utilizados 2880 pintos de corte de um dia, machos da linhagem COBB, provenientes do Incubatório da empresa Frangos Macedo, localizado na Fazenda Albardão, Enseada de Brito no município de Palhoça – SC.

O transporte dos pintos de um dia até a Granja Experimental foi feito através de caminhão adaptado para o transporte de pintos, com temperatura e umidade controlada.

3.1.3. INSTALAÇÃO E MANEJO

O galpão experimental utilizado no experimento, estava subdividido em unidades de 4m² (bacias). As bacias estavam equipadas com um bebedouro automático do tipo niple e um comedouro pendular com capacidade para 20 Kg de ração (Anexo 1). As sessenta e quatro bacias receberam, após o vazio sanitário de quinze dias, uma camada de cepilho (maravalha de madeira) de aproximadamente vinte centímetros de altura. Cada baía recebeu uma ficha de identificação, na qual constou, além do número da baía e do tratamento, os registros de mortalidade, de consumo de ração e de peso dos animais (Anexo 2). As bacias receberam

quarenta e cinco pintos de um dia cada uma. Considerou-se cada baia uma repetição experimental.

A temperatura e a umidade dentro do galpão foram controladas com o auxílio de termômetros, ventiladores elétricos, nebulizadores, campânulas e cortinas de plástico (Anexo 1).

As rações experimentais foram depositadas em um conjunto de silos enumerados na entrada do galpão (Anexo 1). Cada tipo de ração constituiu um tratamento experimental (Tab. 1 e Tab. 2).

O experimento teve duração de quarenta e oito dias. Do primeiro ao quadragésimo segundo dia as aves receberam as rações experimentais e do quadragésimo terceiro ao quadragésimo oitavo dia, receberam ração de retirada (ração sem aditivo) conforme a portaria nº 159, de 19 de junho de 1992 do Ministério da Agricultura. Os animais foram pesados nas idades de 7, 21 e 48 dias (Anexo 1).

Tabela 1 – Composição percentual e química das rações experimentais.

Ingredientes %	Ração inicial	Ração Crescimento	Ração Retirada
Milho	54,3327	67,0724	75,1386
Farinha de Carne	-	4,431	2,8481
Farelo de soja	38,4887	24,1694	13,2824
Óleo de soja	2,8695	-	-
Óleo de frango	-	2,5835	2,0235
Sal	0,7153	0,3425	0,2782
Farinha de penas			5
Farinha de ostras	1,5489	0,6455	0,6681
Fosfato atual	1,5212	-	-
Premix RI Vit.	0,2	-	-
Premix RC Vit.	-	0,2	-
Premix RR Vit.	-	-	0,1
Premix Mín.	0,1	0,1	-
Cloreto de Colina 70%	0,0337	0,0245	0,0295
Hidróxido análogo	-	0,3118	0,2597
Aditivo testado *	*	*	*
Composição calculada			
Proteína Bruta %	22	18,3	17,22
Energia Metabolizável (Kcal EM/Kg)	2950	3100	3150
Gordura %	5,29	5,88	5,933
Fibra %	3,158	2,819	2,452

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiotico[®]Plus); Tratamento 8 (Bioplçus[®] 2B).

3.1.4. TRATAMENTOS

Os animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos e 8 repetições (Anexo 1). Cada tratamento correspondeu a um tipo de ração, que foi constituída por um aditivo específico, com função de promotor de crescimento na sua composição. Os tratamentos utilizados no experimento, bem como as suas composições, são demonstrados na tab. 2.

Tabela 2 - Composição dos tratamentos experimentais

TRATAMENTO	PROMOTOR DE CRSCIMENTO		
	ADITIVO	CONCENTRAÇÃO	Kg/Ton
1	Controle	Sem antimicrobiano e probiótico	
2	Antimicrobiano	40 ppm de nitrovin e 10 ppm de virginiamicina	1
3	Antimicrobiano	7,5 ppm avilamicina e 40 ppm de olaquinox	1
4	Antimicrobiano	80 ppm de nitrovin e 20 ppm de virginiamicina	1
5	Antimicrobiano	15 ppm avilamicina e 80 ppm de olaquinox	1
6	Probiótico	Colustrum [®] Avis: 2/ave no primeiro dia até consumo total. Após, ração controle (RC).	
7	Probiótico	Simbiótico [®] Plus nos primeiros sete dias. Após, RC.	
8	probiótico	Bioplus [®] 2B	1 Kg

O tratamento 1 (T1) foi considerado o tratamento controle. Neste tratamento os animais receberam ração sem antimicrobiano e sem probiótico (ração controle).

Os tratamentos 2 e 4 (T2 e T4) e os tratamentos 3 e 5 (T3 e T5) foram formados pelos mesmos tipos de antimicrobianos, diferindo entre si apenas na quantidade. O T4 recebeu o dobro da quantidade de antimicrobiano do T2, e o T5 o dobro da quantidade de antimicrobiano do T3. Os tratamentos com o dobro da quantidade de antimicrobianos, foram constituídos para investigar, se uma quantidade de antimicrobiano maior do que a recomendada pelo fabricante, implicaria na ocorrência de resíduos dessas substâncias na cama de aviário e consequentemente no ambiente.

O tratamento 6 (T6) foi formado pelo probiótico de nome comercial Colustrum[®] Avis, composto de bactérias anaeróbias (10^7 UFC/g), do gênero *Enterococcus* (10^6 UFC/g), coliformes não patogênicos (10^5 UFC/g), bactérias produtoras de ácido lático (10^7 UFC/g); mananoligossacarídeos (20%) e lactose (15%). A quantidade administrada foi de 2g/ave no primeiro dia de vida do frango, após o completo consumo desta quantidade, utilizou-se ração controle até o abate.

O tratamento 7 (T7) foi formado pelo probiótico de nome comercial Simbiótico[®] Plus. Os animais deste tratamento receberam esse probiótico integralmente do primeiro ao sétimo dia de idade, após esse período forneceu-se ração controle. O produto apresenta em sua composição bactérias anaeróbias (10^7 UFC/g), bactérias do gênero *Enterococcus* (10^6 UFC/g), coliformes não patogênicos (10^5 UFC/g), bactérias produtoras de ácido lático (10^7 UFC/g); mananoligossacarídeos (85%) e lactose (14%).

O tratamento 8 (T8) foi formado pelo probiótico de nome comercial BioPlus[®] 2B, composto de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ($3,2 \times 10^6$ UFC/g). Esse composto foi adicionado na ração na proporção de 1 Kg por tonelada e distribuído a vontade para as aves, do primeiro ao quadragésimo segundo dia de vida dos frangos.

3.1.5. PARÂMETROS AVALIADOS

Durante o período experimental avaliou-se o consumo de ração (CR), peso vivo (PV), o ganho de peso (GP), a conversão alimentar (CR/GP) e a mortalidade.

Um dia antes do abate foram selecionadas aleatoriamente, pesadas e identificadas duas aves de cada baia, as quais foram submetidas à restrição alimentar pré-abate de doze horas. O transporte da granja ao abatedouro ocorreu às seis horas da manhã. No abate, se avaliou o rendimento de carcaça, o rendimento de coxa e sobrecoxa e o rendimento de coração e fígado.

Determinou-se também o Fator de Produção para os diferentes tratamentos. A fórmula utilizada foi: , onde:

- FP representa o fator de produção,
- PV o peso vivo (Kg),
- V a viabilidade (quantidade de animais vivos),
- CA representa a conversão alimentar e
- I a idade de abate (dia).

3.1.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados utilizando-se o programa SYSTAT (SYSTAT FOR WINDOWS, 1994), usando-se o modelo linear de análise de variância. As médias dos parâmetros foram comparadas pelo teste TUKEY, sendo o nível de significância de $p > 0,05$ considerado capaz de revelar diferenças significativas entre grupos.

3.2. ETAPA ANALÍTICA

3.2.1. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

O teor residual de nitrovin foi determinado nas amostras de cama de aviário provenientes de frangos que receberam ração aditivada com os antimicrobianos nitrovin e virginiamicina (Tratamentos 2 e 4), enquanto a análise de olaquinox foi realizada em amostras de mesma matriz, provenientes de frangos que receberam ração aditivada com olaquinox e avilamicina (Tratamentos 3 e 5). A avilamicina e a virginiamicina não foram analisadas por dificuldades técnicas.

As concentrações de nitrovin e olaquinox foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase-reversa acoplada a um detector ultravioleta, no comprimento de onda 380 e 376 nm respectivamente.

3.2.1.1. INSTRUMENTAL UTILIZADO

A análise cromatográfica foi realizada com um sistema para CLAE da marca Shimadzu Co., Japão, constituído de uma bomba modelo LC-10 AS, acoplada a um detector ultravioleta, modelo SPD-10A, sendo o sinal transcrito por um integrador computadorizado, modelo Chromatopac C-R6A. As amostras foram injetadas manualmente através de uma válvula injetora Rheodyne, modelo 7125, equipada com septo (loop) de 20 ou 200 µl (Rheodyne, Cotati, CA, USA). Foi empregada uma coluna analítica de fase-reversa, tipo C18, empacotada com um polímero de sílica de octadecilsilano (Spherisorb S5 ODS-2, 5µm, 250 x 4,6 mm, marca Phase Sep, Deeside Ind. Est., Queensferry, Clwyd, UK) a qual foi protegida por uma guarda-coluna de aço inoxidável 20 x 2 mm, empacotada com partículas de octadecilsilano de tipo pelicular (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

3.2.1.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A fase móvel foi constituída de uma mistura volumétrica de acetonitrila - ácido acético glacial - água - dietilamina (50: 49: 1: 0,05; em ml) para o nitrovin e de uma mistura volumétrica de metanol - água (15 : 85) para o olaquinox. Estas soluções foram desgaseificadas por ultra-som e filtradas a vácuo em membrana de náilon com 0,45µm de porosidade e então bombeadas de modo isocrático a um fluxo de 1,0 ml/min. através da coluna analítica mantida à temperatura ambiente.

Os picos foram detectados pela absorvância de luz ultravioleta em comprimentos de onda (λ) de 380 nm para o nitrovin e 376 nm para o olaquinox, sendo a sensibilidade do detector de 0,005 AUFS para a análise dos dois compostos.

3.3.1.3. DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram empregados padrões de nitrovin (98,2%) e olaquinox (99,8%), assim como reagentes e solventes de grau cromatográfico como: dietilamina, acetonitrila, dimetilformamida e metanol da marca Tedia e Nuclear.

As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (resistividade maior que 18,2 mohm·cm) produzida por um sistema purificador modelo Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, USA).

As soluções padrões dos analitos foram preparadas por diluição seriada após dissolver-se 5 mg da droga, previamente dessecada durante um dia em dessecador à vácuo contendo sílica-gel, com 50 ml de acetonitrila – dimetilformamida (50 : 50) ou metanol – água (15 : 85), respectivamente para o nitrovin e olaquinox. Soluções de 1,0; 10,0 e 100,0 ppm foram preparadas no início dos ensaios e mantidas a -20°C até o momento de uso, quando então eram deixadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz para reequilibrar antes de serem utilizadas.

3.2.1.4. PROCEDIMENTOS

3.2.1.4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Sessenta e quatro amostras de cama, correspondentes as 64 baias do experimento, foram coletadas no 48^o dia (último dia do experimento). Cada amostra com aproximadamente 1 Kg de cama, constituída a partir de coletas em dez pontos equidistantes de cada baia, foi etiquetada e transportada da granja experimental até o Laboratório de Farmacocinética. No laboratório, alíquotas das amostras (~30 gramas) foram transferidas para potes plásticos e postos a secar em estufa a 40°C até a estabilização do peso, quando então foram armazenadas a -20°C.

No mesmo dia foram coletadas amostras (~50 Kg) da cama de cada baia. As amostras foram colocadas em sacos de lona plástica (100 L), identificadas e transportadas até o Departamento de Zootecnia – CCA – UFSC, onde ficaram empilhadas umas do lado das outras, agrupadas por tratamento. As amostras permaneceram, dessa forma, por 180 dias, para

evidenciar a degradação dos antibacterianos fornecidos aos animais durante esse período. Foram retiradas amostras para análise aos 60, 120 e 180 dias. Procurou-se reproduzir o que é feito pelo agricultor atualmente, que é retirar a cama do aviário e “estocá-la” na propriedade por até 180 dias (para posteriormente utilizá-la como adubo).

3.2.1.4.2. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os antimicrobianos foram extraídos de alíquotas de 1,0 g de amostra de cama seca, em tubo de ensaio de 20 mL, com 10 ml de acetonitrila-dimetilformamida (50:50) para o nitrovin e 10 ml de acetonitrila na presença de 2,0 g de sulfato de sódio anidro, para o olaquinox. Em seguida, os tubos foram mantidos em banho de ultra-som durante 20 minutos, agitando-se vigorosamente em vortéx durante 1 min., a cada intervalo de 4 min. Após, 5 ml da fase orgânica foram transferidos para tubos de 10 ml e centrifugados a 2000 g (4 000 rpm) por 10 min.

Para a análise do nitrovin, 1,0 ml da solução de extração foi transferido para um microtubo tipo Eppendorf, centrifugado a 20000 g (14 000 rpm), por 10 min., a 4 °C, e uma alíquota de 40 µl foi injetado no cromatógrafo equipado com um septo de 20 µl.

Para o ensaio do olaquinox, 2,0 ml da solução de extração foram transferidos para tubos de 5 ml, evaporados em banho-maria a 37°C sob uma corrente suave de N₂. O resíduo foi dissolvido em 400 µl de fase móvel com auxílio de vórtex e banho de ultra-som, transferido para um microtubo tipo Eppendorf, centrifugado a 20000 g (14 000 rpm), por 10 min., a 4 °C, e uma alíquota de 100 µl foi injetado no cromatógrafo equipado com um septo de 200 µl.

Todo o processo de extração do olaquinox foi protegido da luz actínica, mantendo-se apenas uma penumbra no ambiente para evitar a decomposição da substância.

Após o preparo, as amostras de nitrovin e olaquinox foram protegidas da luz, mantidas sob refrigeração (4 - 8 °C) por uma noite e transportadas em embalagem térmica hermeticamente fechada até o Laboratório de Cromatografia.

3.2.1.4.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO

As soluções utilizadas na construção da curva de calibração foram preparadas com as soluções estoques dos padrões diluídos nos solventes de extração. Para tal, 1g de cama de aviário (amostra isenta de nitrovin e olaquinox) foi contaminado com 10 ml de solvente extrator contendo quantidades conhecidas do analito. Com base na quantidade do composto

que esperava-se encontrar na cama, estabeleceu-se que na curva de calibração seriam utilizadas soluções com as seguintes concentrações: 0,0; 1,0; 3,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0 ppm para o nitrovin e 0,0; 1,0; 3,0; 6,0; 8,0; 10,0 ppm para o olaquinox.

3.2.1.4.4. CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES

A equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear baseada no método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi traçada lançando-se no eixo dos “*x*” as diferentes concentrações das soluções padrões e no eixo dos “*y*” as áreas dos picos correspondentes a droga. As concentrações de nitrovin e olaquinox nas “amostras desconhecidas” foram calculadas pelo emprego da equação ($y = ax + b$), onde *x* é a concentração da droga na cama (ppm = µg/g), *y* é a área do pico da droga, *a* é a inclinação da reta e *b* é o valor do intercepto (LAU et al., 1987).

3.2.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

3.2.2.1. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DO ENSAIO

Para avaliar a reprodutibilidade e a repetibilidade do método analítico foi realizado o inter-ensaio e o intra-ensaio e calculada a precisão e exatidão dos mesmos.

Para a realização do inter-ensaio várias amostras de mesma concentração da curva de calibração foram preparadas como descrito no item 3.2.1.4.3 e analisadas como amostras desconhecidas em vários ensaios (cada um feito em dias diferentes).

Para a realização do intra-ensaio, 5 amostras de cama foram contaminadas com 2 concentrações diferentes de nitrovin (6 e 15 ppm) e olaquinox (3 e 8 ppm) e analisadas como amostras desconhecidas num único ensaio (feito no mesmo dia).

A precisão, expressa pelo Coeficiente de Variação (C. V., em %) foi calculada como sendo: $\text{Desvio padrão} \div \text{média} \times 100$.

A exatidão, expressa em porcentagem (%), foi calculada como segue: $\text{Concentração obtida (ppm)} \div \text{Concentração adicionada (ppm)} \times 100$ (DEMOTES-MAINAIRD et al., 1989).

3.2.2.2. RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

A recuperação do analito pelo processo de extração foi avaliada no intra-ensaio com 5 amostras de matriz contaminadas com 2 concentrações diferentes de nitrovin (6 e 15 ppm) ou olaquinox (3 e 8 ppm) e analisadas pelo mesmo método como amostras desconhecidas num único ensaio. A recuperação, expressa pela porcentagem (%) da droga extraída da matriz, foi comparada com a resposta obtida com a injeção de 5 alíquotas de soluções padrões de

concentrações equivalentes de nitrovin e olaquinox, preparadas em fase móvel (sem extração) e injetadas diretamente no cromatógrafo. O cálculo da recuperação (%) foi realizado dividindo-se a área do pico de nitrovin ou olaquinox da amostra padrão na matriz (cama) pela área do pico do respectivo analito na solução padrão de concentração correspondente preparada em fase móvel. A razão foi multiplicada por 100 para expressar a % de recuperação.

3.2.2.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Soluções padrões de nitrovin e olaquinox foram preparadas em fase-móvel (1 e 10 ppm), mantidas sob refrigeração (4 a 8 °C) e ao abrigo da luz até o término dos ensaios. Em cada ensaio cromatográfico, duas alíquotas das soluções foram injetadas no cromatógrafo e suas respectivas áreas dos picos comparadas com as anteriores com o objetivo de detectar alterações na estabilidade dos compostos durante as análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DOS ANIMAIS

Nas condições experimentais deste trabalho, foram utilizados antimicrobianos e probióticos como aditivo na alimentação de frangos de corte. A comparação do desempenho zootécnico, foi feita através da análise dos parâmetros de peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar para os períodos de 0 a 21; 21 a 48 e 0 a 48 dias de idade. Nas tabelas 3, 4 e 5, encontram-se os resultados obtidos para os três períodos analisados.

Pode-se observar que não houve diferenças significativas nos resultados para todos os tratamentos em relação ao tratamento controle, para os parâmetros peso vivo, ganho de peso e consumo de ração nos três períodos analisados (Tab. 3 a 5).

Para a conversão alimentar pode-se observar que, no período de 0 a 21 dias de idade (Tab. 3) os probióticos do tratamento 7 (Simbiótico[®] Plus – composto principalmente de enterococcus e coliformes não patogênicos) e tratamento 8 (probiótico Bio plus[®] 2B – *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) tiveram um aumento significativo ($p > 0,05\%$) em relação aos demais tratamentos. No período de 21 a 48 dias de idade (Tab. 4), o probiótico do tratamento 6 (Colustrum[®] Avis – composto principalmente de bactérias anaeróbias, enterococcus e coliformes não patogênicos) também apresentou um aumento significativo ($p > 0,05\%$) em relação aos tratamentos 2 (40 ppm de nitrovin e 10 ppm de virginamicina) e 5 (15 ppm avilamicina e 80 ppm de olaquinox), traduzindo-se num menor desempenho para conversão alimentar, o mesmo acontecendo para os tratamentos 6 e 7 em relação aos tratamentos 2, 4 e 5 (com antimicrobianos) no período de 0 aos 48 dias de idade (Tab. 5).

Essa diferença de resultados entre os tratamentos para a conversão alimentar (CA) se reflete nos custos de produção como pode ser observado na tabela 6. Observa-se que o custo obtido pela diferença da melhor CA em relação a pior é de R\$ 0,09 por frango e R\$ 1620,00 por lote. Se considerarmos, na análise de custos, somente os parâmetros apresentados na tabela 6, o uso dos probióticos onera o custo de produção. Entretanto, se considerarmos, que este produto “traz menos riscos a saúde do homem e ao ambiente”, se poderá agregar um valor maior ao frango produzido, compensando assim o aumento do custo de produção.

Tabela 3 – Médias (\pm Desvio Padrão) do peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte no período de 0 - 21 dias de idades nos diferentes tratamentos (rações com e sem promotor de crescimento).

Tratamentos*	PV ¹ (g)	GP ¹ (g)	CR ¹ (g)	CA ¹
1	852 ^{ab} \pm 34	809 ^{ab} \pm 34	866 ^{ab} \pm 49	1,07 ^{ab} \pm 0,07
2	863 ^{ab} \pm 34	820 ^{ab} \pm 34	842 ^a \pm 88	1,03 ^a \pm 0,09
3	864 ^{ab} \pm 36	822 ^{ab} \pm 36	813 ^a \pm 51	0,99 ^a \pm 0,06
4	891 ^b \pm 39	849 ^b \pm 39	821 ^a \pm 75	0,97 ^a \pm 0,11
5	889 ^b \pm 44	846 ^b \pm 44	817 ^a \pm 75	0,96 ^a \pm 0,08
6	872 ^{ab} \pm 41	829 ^{ab} \pm 41	874 ^{ab} \pm 55	1,06 ^a \pm 0,10
7	825 ^a \pm 25	783 ^a \pm 25	964 ^b \pm 33	1,23 ^b \pm 0,06
8	837 ^{ab} \pm 28	794 ^{ab} \pm 28	962 ^b \pm 35	1,21 ^b \pm 0,05
CV (%)	4,0	4,2	6,9	7,0

Médias com letras iguais no sentido da coluna não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de TUKEY.

¹ Valores médios com 8 repetições de 45 aves cada.

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiotico[®] Plus); Tratamento 8 (Bioplus[®] 2B).

Tabela 4 - Médias (\pm Desvio Padrão) do peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte no período de 21- 48 dias de idade nos diferentes tratamentos (rações com e sem promotor de crescimento).

Tratamentos*	PV ¹ (g)	GP ¹ (g)	CR ¹ (g)	CA ¹
1	2976 ^a \pm 138	2,124 ^a \pm 117	4956 ^a \pm 103	2,34 ^{ab} \pm 0,11
2	3087 ^a \pm 168	2224 ^a \pm 150	4866 ^a \pm 307	2,20 ^a \pm 0,17
3	3015 ^a \pm 93	2150 ^a \pm 74	4867 ^a \pm 98	2,20 ^{ab} \pm 0,06
4	3076 ^a \pm 218	2184 ^a \pm 201	4876 ^a \pm 277	2,24 ^{ab} \pm 0,11
5	3106 ^a \pm 44	2217 ^a \pm 44	4867 ^a \pm 75	2,20 ^a \pm 0,08
6	2946 ^a \pm 114	2074 ^a \pm 89	4944 ^a \pm 51	2,39 ^b \pm 0,11
7	2989 ^a \pm 160	2163 ^a \pm 145	4991 ^a \pm 69	2,32 ^{ab} \pm 0,16
8	3007 ^a \pm 28	2170 ^a \pm 28	4949 ^a \pm 35	2,28 ^{ab} \pm 0,05
CV (%)	3,8	5,3	3,0	4,5

Médias com letras iguais no sentido da coluna não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de TUKEY.

¹ Valores médios com 8 repetições de 45 aves cada.

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiotico[®] Plus); Tratamento 8 (Bioplus[®] 2B).

Tabela 5 - Médias (\pm Desvio Padrão) do peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte no período de 0 - 48 dias de idade nos diferentes tratamentos (rações com e sem promotor de crescimento).

Tratamentos*	PV ¹ (g)	GP ¹ (g)	CR ¹ (g)	CA ¹
1	2976 ^a \pm 138	2933 ^a \pm 138	5822 ^a \pm 115	1,99 ^{bc} \pm 0,09
2	3087 ^a \pm 168	3044 ^a \pm 168	5708 ^a \pm 390	1,88 ^{ab} \pm 0,13
3	3015 ^a \pm 93	2972 ^a \pm 93	5681 ^a \pm 119	1,91 ^{abc} \pm 0,05
4	3076 ^a \pm 218	3033 ^a \pm 218	5697 ^a \pm 299	1,88 ^{ab} \pm 0,06
5	3106 ^a \pm 44	3063 ^a \pm 52	5684 ^a \pm 148	1,86 ^a \pm 0,05
6	2946 ^a \pm 114	2903 ^a \pm 114	5818 ^a \pm 71	2,01 ^c \pm 0,08
7	2989 ^a \pm 160	2946 ^a \pm 160	5955 ^a \pm 42	2,03 ^c \pm 0,11
8	3007 ^a \pm 28	2964 ^a \pm 105	5911 ^a \pm 177	1,99 ^{bc} \pm 0,06
CV (%)	3,8	3,8	2,7	4,0

Médias com letras iguais no sentido da coluna não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de TUKEY.

¹ Valores médios com 8 repetições de 45 aves cada.

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiotico[®] Plus); Tratamento 8 (Bioplus[®] 2B).

Tabela 6 – Custo de produção por frango e por lote (18000 frangos) com base na conversão alimentar dos 8 tratamentos analisados.

Tratamento*	PV (Kg)	CA	Custo / frango (R\$)	Custo / lote (R\$)
1	2,976	1,99	1,78	31980,10
2	3,087	1,88	1,74	31339,22
3	3,015	1,91	1,73	31096,71
4	3,076	1,88	1,73	31227,55
5	3,106	1,86	1,73	31196,66
6	2,946	2,01	1,78	31975,88
7	2,989	2,03	1,82	32765,42
8	3,007	1,99	1,80	32313,22

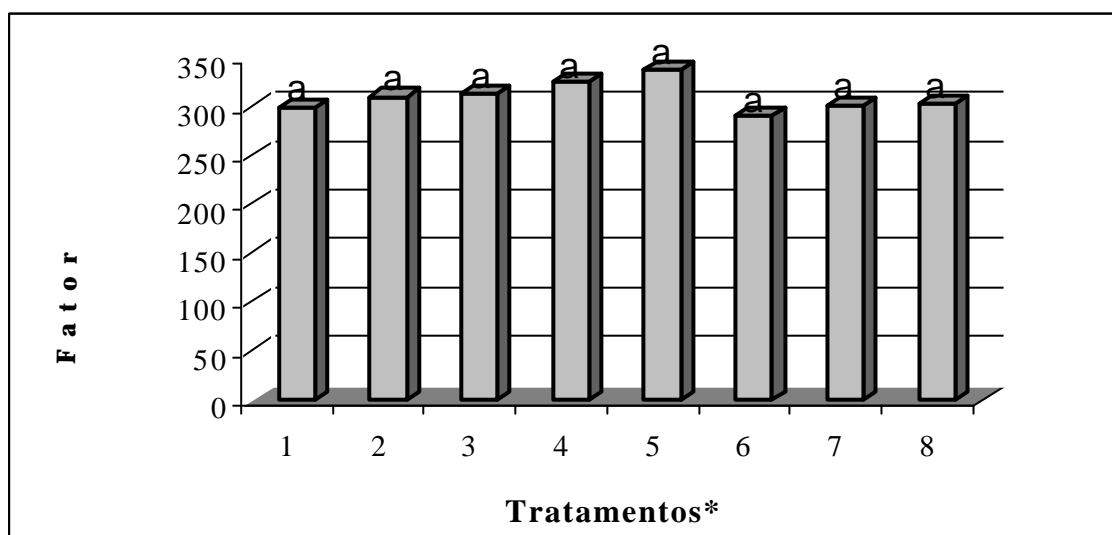
Ração = R\$ 300,00/tonelada; Custo/frango = CA*PV*(300/1000); Custo/lote = C A*PV*18000*(300/1000)

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiotico[®] Plus); Tratamento 8 (Bioplus[®] 2B).

Com exceção da conversão alimentar, os resultados aqui obtidos estão de acordo com os resultados encontrados por HENRIQUE et al. (1998) quando compararam dois tipos de probióticos (uma mistura de *Lactobacillus acidophylus*, *Sacaromyces cerevisiae* e *Enterococcus faecium*, e outro composto por *Bacillus subtilis*) com dois tipos de antibióticos (virginiamicina e avilamicina). Eles avaliaram a eficiência dessas substâncias sobre os parâmetros, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, fator de produção e rendimento de carcaça. Observaram que a utilização tanto dos antibióticos quanto dos probióticos não promoveram melhoria significativa no ganho de peso, no consumo de ração, no fator de produção e na conversão alimentar. No entanto, GONZALES et al. (1998a) utilizando o probiótico constituído por *Enterococcus Faecium* e o antibiótico Avoparcina[®], observaram uma melhora no ganho de peso e na conversão alimentar para as aves que não receberam probiótico. BERTECHINI & HOSSAIN (1993), também verificaram uma melhora significativa no ganho de peso e na conversão alimentar de frangos de corte suplementados com probiótico (Biobac[®]) e com antibiótico (virginiamicina).

Na Figura 1 e na Tabela 7 encontram-se respectivamente, os resultados obtidos para o fator de produção e os rendimentos de carcaça, de coxa e sobre-coxa, de peito, de coração e de fígado. Pode-se observar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) para os parâmetros fator de produção (Fig. 1) e rendimentos de carcaça, coxa e sobre-coxa, peito, coração e fígado em todos os tratamentos analisados (Tab. 7).

Esses resultados confirmam os encontrados por GONZALES et al. (1998b) que ao utilizar isoladamente o probiótico composto por *Enterococcus faecium* e o antibiótico avoparcina[®] como aditivos na ração, não observaram diferenças significativas entre os resultados. HENRIQUE et al. (1998) e BERTECHINI & HOSSAIN (1993) também não encontraram diferenças significativas para o rendimento de carcaça entre os tratamentos com probióticos e com antibióticos utilizados isoladamente.



Médias com letras iguais não diferem ($P>0,05$) pelo teste de TUKEY.

Figura 1 – Fator de Produção de frangos de corte de 0 - 48 dias de idade para 8 tratamentos analisados.

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiótico[®] Plus); Tratamento 8 (Bioplus[®] 2B).

Tabela 7 - Rendimentos de Carcaça (RCAR), Rendimento de Peito (RPEI), Rendimento de Coxa e Sobre-coxa (RCSBC), de Rendimento Coração (RCOR) e Rendimento de fígado (RFIG) de frangos de corte no período de 0 - 48 dias de idade nos diferentes tratamentos (com e sem promotor de crescimento).

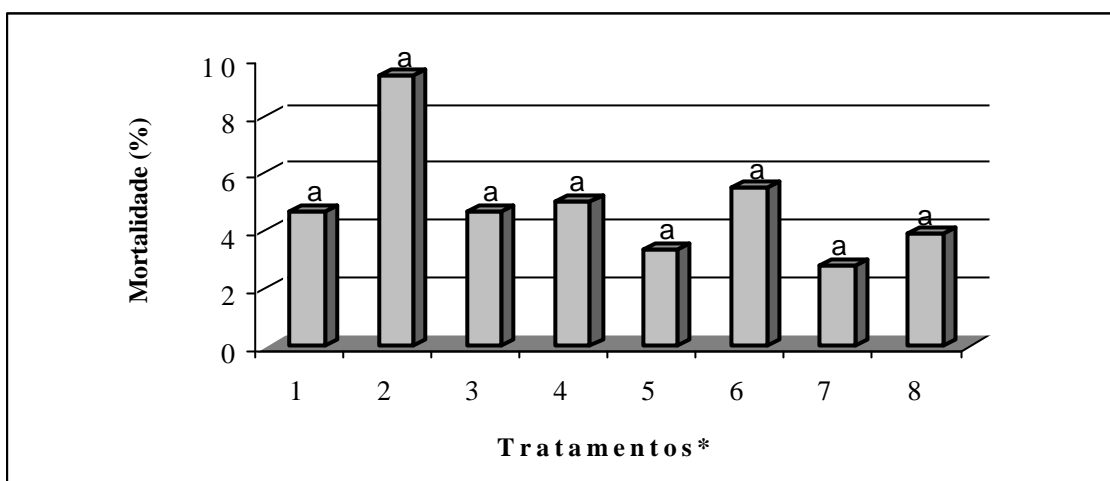
Tratamento*	RCAR ¹ (%)	REPEI ¹ (%)	RCSBC ¹ (g)	RCOR ¹ (g)	RFIG ¹ (g)
1	71 _a ± 6,67	23 _a ± 1,74	32 _a ± 1,70	0,6 _a ± 0,14	3,5 _a ± 0,55
2	70 _a ± 2,41	24 _a ± 2,19	31 _a ± 1,93	0,6 _a ± 0,04	3,3 _a ± 0,46
3	74 _a ± 2,22	29 _a ± 2,79	34 _a ± 1,56	0,8 _a ± 0,08	3,3 _a ± 0,60
4	69 _a ± 1,61	24 _a ± 1,37	31 _a ± 0,07	0,6 _a ± 0,07	2,9 _a ± 0,73
5	70 _a ± 1,80	24 _a ± 0,94	32 _a ± 1,69	0,6 _a ± 0,09	3,2 _a ± 0,50
6	75 _a ± 3,19	27 _a ± 1,39	35 _a ± 2,84	0,7 _a ± 0,07	3,2 _a ± 0,44
7	69 _a ± 3,81	25 _a ± 2,14	31 _a ± 1,58	0,6 _a ± 0,10	3,5 _a ± 0,47
8	70 _a ± 2,95	24 _a ± 2,27	31 _a ± 1,56	0,6 _a ± 0,08	3,3 _a ± 0,37
CV	0,04	0,08	0,06	0,14	0,17

Médias com letras iguais no sentido da coluna não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de TUKEY.

¹ Valores médios com 8 repetições de 45 aves cada.

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiotico[®] Plus); Tratamento 8 (Bioplus[®] 2B).

Os percentuais de mortalidade (Fig. 2) encontrados neste experimento, não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) para todos os tratamentos analisados. Esses resultados diferem dos encontrados por HENRIQUE et al. (1997) e (1998), que verificaram que a mortalidade foi diminuída pela presença dos probióticos estudados. Nestes trabalhos verificou-se que os probióticos reduziram significativamente ($p < 0,01$) a mortalidade em 47,1% e 48,5%, respectivamente. Da mesma forma que se observou um aumento significativo ($p > 0,05$) da mortalidade quando em presença dos antibióticos avaliados nas rações de ambos os experimentos.



Médias com letras iguais não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de TUKEY.

Figura 2 - Mortalidade de frangos de corte de 0 - 48 dias de idade para os 8 tratamentos analisados.

*Tratamento 1 (sem aditivo); Tratamento 2 (40 ppm Nitrovin[®] e 10 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 3 (7,5 ppm Avilamicina[®] e 40 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 4 (80 ppm Nitrovin[®] e 20 ppm Virginiamicina[®]); Tratamento 5 (15 ppm Avilamicina[®] e 80 ppm Olaquinox[®]); Tratamento 6 (Colostrum[®] avis); Tratamento 7 (Simbiotico[®] Plus); Tratamento 8 (Bioplus[®] 2B).

A utilização experimental dos probióticos nem sempre tem apresentado resultados positivos em relação a ganho de peso e a conversão alimentar das aves. As divergências dos resultados experimentais já publicados podem estar relacionados, com as condições de higiene das instalações (tempo de desocupação do galpão e nível de contaminação ambiental), com o manejo (dos equipamentos, dos animais, etc) e o estado sanitário das aves. Aves alojadas em locais que se apresentam há bastante tempo desocupados ou com baixo nível de contaminação ambiental, tendem a apresentar resultados pouco significativos em relação à utilização de probióticos (KUSSAKAWA, 1999). Neste experimento as aves foram criadas dentro de ótimas condições profiláticas. Essas condições podem ter favorecido a não se encontrar diferenças significativas entre a utilização dos antimicrobianos e dos probióticos em relação ao tratamento controle (tratamento sem promotores de crescimento ($p > 0,05$) para todos os parâmetros analisados, com exceção da conversão alimentar.

4.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROVIN E DE OLAQUINDOX NA CAMA DE AVIÁRIO

As indústrias fornecedoras de promotores de crescimento garantem que eles não são absorvidos pelas membranas das paredes intestinais dos animais e são eliminados através das fezes, onde são rapidamente biodegradados; não causando riscos a saúde humana e ao ambiente (MOTA, 1996; FEFANA, 1997). Porém, se a degradação dessas substâncias não ocorrer rapidamente, o risco de uma resistência microbiológica pode ser eminente. Além do mais algumas dessas substâncias são potencialmente carcinogênicas, o que pode implicar em riscos a saúde humana. Preocupações como essas nos levaram a analisar resíduos das substâncias antimicrobianas (promotoras de crescimento) na cama de aviário. Duas substâncias antimicrobianas foram analisadas: nitrovin e olaquinox.

Na literatura estão descritos alguns métodos para a quantificação de nitrovin e olaquinox por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em diferentes tipos de matrizes. Assim, são descritos métodos para análise de nitrovin em ração (GLIDDON et al., 1983; ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1991) e olaquinox em ração (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1985), em solo (INGERSLEV, 2001) e em tecido (SINIGOJ, 1997). Entretanto, não foi encontrado na literatura uma metodologia para a quantificação dessas duas substâncias na cama de aviário, havendo a necessidade de se validar uma metodologia para que os resultados por nós apresentados pudessem ser confiáveis; sendo o trabalho aqui desenvolvido, de natureza inédita.

4.2.1. VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS

Nas condições cromatográficas empregadas, os picos dos compostos analisados apresentaram-se estreitos, simétricos e com tempos de retenção de aproximadamente 8 e 6 minutos, respectivamente para o nitrovin e o olaquinox. A Figura 3 apresenta exemplos de cromatogramas obtidos nestas condições, para as amostras de cama de aviário livre de nitrovin (**a**) e olaquinox (**d**); para uma amostra contaminada com 10,0 ppm de nitrovin (**b**) e 3,0 ppm de olaquinox (**e**) e uma amostra de cama com concentrações desconhecidas de nitrovin e olaquinox, respectivamente (**c** e **f**). Ainda, pode ser observado nesta figura, a ausência de picos interferentes, que pudessem prejudicar a análise destes fármacos antimicrobianos. Pode-se notar também que uma corrida cromatográfica é concluída em menos de 10 minutos o que permite realizar a análise de inúmeras amostras durante um dia de trabalho.

A sensibilidade do método mostrou-se adequada e suficiente para o objetivo pretendido, pois é possível quantificar concentrações superiores a 1 ppm de ambas as drogas.

Os métodos que desenvolvemos e validamos para as análises de nitrovin e de olaquinox, combinam o uso de reagentes de fácil aquisição, de um pequeno volume de solvente extrator (10 mL) e de uma quantidade de amostra reduzida (1 g). Contrariamente, os métodos de GLIDDON et al. (1983) e do ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (1985) e (1991), empregaram 100 mL de solvente e 40 - 20 gramas de amostra, respectivamente. Além disso, em nosso método as duas etapas de filtragem da amostra em filtros de papel Whatman nº 1 e em filtros de teflon (PTFE), muito demoradas e dispendiosas, foram substituídas por duas etapas de centrifugação por 10 min., a primeira em 2000 g (4000 rpm) e a última em 20000 g (14000 rpm).

Os métodos desenvolvidos poderão ser aplicados também na quantificação de outros compostos do mesmo grupo farmacológico, que apresentam características físico-químicas e comportamento cromatográfico semelhantes.

Os reagentes e solventes utilizados na validação do método, apresentam as vantagens de terem baixo custo, fácil acesso, estabilidade à temperatura ambiente, baixa pressão de vapor, alto grau de pureza, baixa absorção de luz ultravioleta e baixa toxicidade.

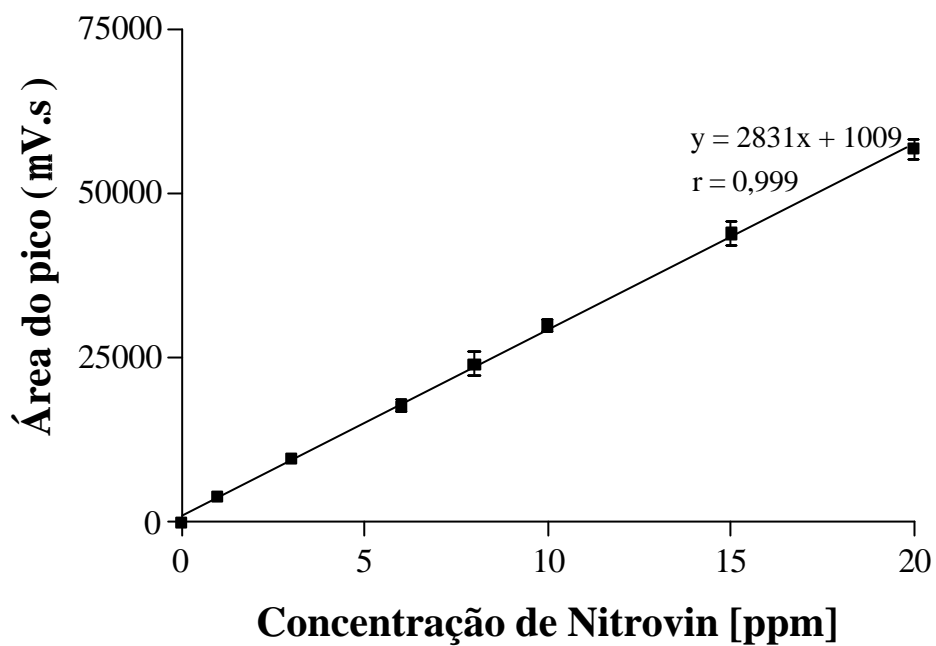
Durante o processo de padronização dos métodos foram utilizados vários solventes extratores. Para a extração do nitrovin testou-se a utilização dos solventes puros: Acetonitrila (ACN), Dimetilformamida (DMF), Metanol (MeOH), Etanol (EtOH) e Acetona e em misturas a 50% (ACN + DMF, ACN + MeOH, DMF + MeOH, DMF + Acetona e DMF + EtOH). A mistura ACN + DMF a 50% foi a que se mostrou mais eficiente. Para a extração do olaquinox foram testados os solventes ACN e DMF puros e também as misturas dos seguintes solventes: ACN+Água=90:10, ACN+DMF=50:50, DMF+Água=95:05, DMF+Diclorometano=(90:10; 50:50; 25:75 e 05:95) e MeOH+Água=(80:20; 50:50 e 30:70). Para facilitar a separação de impurezas nas amostras foram adicionados diferentes sais para “saturar” o solvente extrator. Assim, adicionou-se carbonato de cálcio em ACN a 100%, ACN+Água=90:10 e DMF+Água=95:5; e sulfato de zinco e sulfato de sódio anidro em ACN a 100%. O emprego de sulfato de sódio anidro para a extração de olaquinox com ACN a 100% forneceu o melhor resultado.

As curvas de calibração obtidas com as duas metodologias, as equações das retas (y) e os respectivos coeficientes de regressão linear (r) para os padrões das drogas em estudo são ilustradas na Figura 4 (*a* e *b*). As curvas de calibração calculadas por regressão linear

apresentaram boa linearidade na faixa de concentração das soluções padrões utilizadas, sendo os valores dos coeficientes de regressão linear (r) iguais ou superiores a 0,998.

Figura 3 - Cromatogramas (obtidos por CLAE) de amostras de cama de aviário: **(a e d)** livres de nitrovin e de olaquinox, respectivamente; **(b)** cama contaminada com 10,0 ppm de nitrovin e **(e)** cama analisada com 3,0 ppm de olaquinox; **(c e f)** cama de nitrovin (teor encontrado: 7,0 ppm) e de olaquinox (teor: n. q.). Pico **1**: nitrovin e pico **2**: olaquinox.

a)



b)

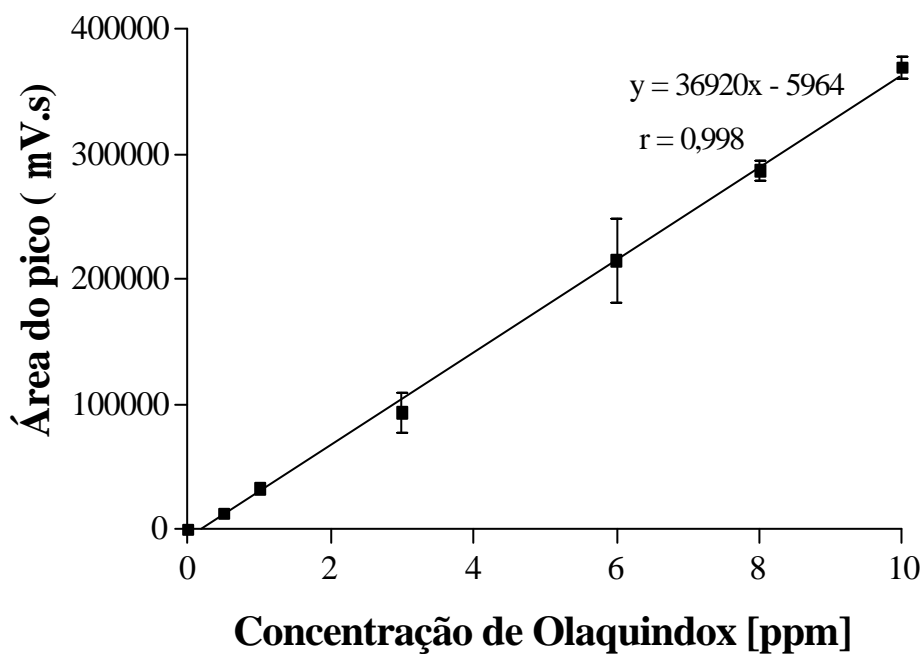


Figura 4 - Curvas de calibração obtidas na análise do nitrovin (a) e do olaquinox (b), em cama de aviário.

A variabilidade dos métodos cromatográficos, avaliada através do cálculo da precisão e da exatidão no inter-ensaio e no intra-ensaio, juntamente com os valores de recuperação do intra-ensaio, é mostrado nas Tabelas 8 e 9.

A variação do intra-ensaio, determinada pela análise de cinco alíquotas de soluções padrões de cama de frango contendo 6,0 e 15,0 ppm de nitrovin e 3,0 e 8,0 ppm de olaquinox, dentro de uma mesma corrida, originou os seguintes valores do CV (%): 3,0 e 3,7% para o nitrovin e 10,5 e 11,0% para o olaquinox (Tab. 8).

A Tabela 8 mostra também o cálculo da exatidão do intra-ensaio, expressa em porcentagem (%). Considerando-se a inclusão de todas as alíquotas das duas concentrações (6,0 e 15,0 ppm), a média da exatidão foi de $102,5 \pm 3,0$ e $98,7 \pm 3,7\%$ (média \pm DP) para as concentrações de nitrovin, respectivamente. A média da exatidão para o olaquinox foi de $109,5 \pm 11,5$ e $105,4 \pm 11,6 \%$ (média \pm DP) para as mesmas concentrações de 3,0 e 8,0 ppm, respectivamente.

Os valores dos coeficientes de variação (CV em %) obtidos no inter-ensaio foram de: 36,6; 4,6; 7,7; 1,9; 3,6; 1,2 e 5,9% para o nitrovin e 30,6; 16,0; 17,6; 2,1 e 5,1% para o olaquinox (Tab. 9).

O procedimento de extração líquido-líquido no ensaio, assegurou uma média de recuperação (% de droga extraída), considerando-se a inclusão de todas as alíquotas utilizadas para cada uma das duas concentrações de nitrovin (6,0 e 15 ppm) e de olaquinox (3,0 e 8,0 ppm), de: $109,8 \pm 4,7 \%$ e $102,0 \pm 7,2 \%$ (média \pm D. P.) para nitrovin e $86,5 \pm 10,6 \%$ e $85,0 \pm 9,1 \%$ para o olaquinox (Tab. 8)

Tabela 8 – Dados de precisão, exatidão e recuperação analítica para o nitrovin e o olaquindox obtidos por CLAE no **intra-ensaio** para validação das metodologias.

Concentração Adicionada (ppm)	Concentração encontrada (ppm)*	Precisão CV(%)	Exatidão (%)*	Recuperação (%)*
Nitrovin				
6,0	6,15 ± 0,18	3,0	102,5 ± 3,0	109,8 ± 4,7
15,0	14,8 ± 0,55	3,7	98,7 ± 3,7	102,0 ± 7,2
Olaquindox				
3,0	3,29 ± 0,35	10,5	109,5 ± 11,5	86,5 ± 10,6
8,0	8,43 ± 0,93	11,0	105,4 ± 11,6	85,0 ± 9,1

* Média ± DP, *número de amostras = 5, DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação, CV(%) = DP/Média x 100.

Tabela 9 – Cálculos da precisão e exatidão para a análise do nitrovin e do olaquinox obtidos por CLAE no **inter-ensaio** para a validação das metodologias.

Concentração Adicionada (ppm)	Concentração encontrada (ppm)*	Precisão CV (%)	Exatidão (%)*
Nitrovin			
1,0	1,04 ± 0,38	36,6	107,7 ± 21,5
3,0	3,06 ± 0,14	4,6	102,0 ± 4,7
6,0	6,02 ± 0,46	7,7	100,4 ± 7,7
8,0	7,83 ± 0,15	1,9	97,8 ± 1,9
10,0	9,84 ± 0,35	3,6	98,4 ± 3,5
15,0	15,30 ± 0,18	1,2	102,0 ± 1,2
20,0	19,39 ± 1,14	5,9	97,0 ± 5,7
Olaquinox			
1,0	1,11 ± 0,34	30,6	110,8 ± 33,9
3,0	2,76 ± 0,44	16,0	92,0 ± 14,7
6,0	6,18 ± 1,09	17,6	103,0 ± 18,2
8,0	9,84 ± 0,35	2,1	98,4 ± 2,1
10,0	10,04 ± 0,51	5,1	100,4 ± 5,1

* Média ± DP, *número de amostras = 5, DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação, CV(%) = DP/Média x 100.

4.2.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROVIN NA CAMA DE AVIÁRIO

Nas condições deste experimento foram analisadas as amostras de cama dos tratamentos 2 e 4 que receberam ração aditivada com 40 ppm e 80 ppm de nitrovin, respectivamente. Apesar da concentração de nitrovin no T4 ser duas vezes superior a do T2 não foi observado um aumento proporcional da concentração desta substância nas amostras de cama analisadas. Estes resultados podem estar associados à variabilidade dos ensaios devido à heterogeneidade desta matriz (cama de aviário).

As concentrações mais elevadas de nitrovin foram encontradas nas amostras de cama recém coletadas (Período 0). Neste grupo a concentração variou de 2 a 22 ppm, sendo as médias de 8,9 e 11,6 ppm para as amostras dos tratamentos 2 e 4, respectivamente (anexo 3). A partir do período de 60 dias de compostagem o teor de nitrovin foi bastante reduzido para a maioria das amostras e em algumas delas este composto não foi mais detectado. Entretanto, para outras amostras, a concentração de nitrovin se manteve acima de 4 ppm, mesmo após um período de 180 dias de compostagem da cama (Anexo 3, Fig. 5 e Tab. 10).

A tabela 10 apresenta as médias e os respectivos desvios padrões das concentrações de nitrovin nas amostras do T2 e T4 nos 4 períodos de compostagem. Pode-se observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações de nitrovin encontradas entre os tratamentos T2 e T4 nos períodos analisados, com exceção do período 180 dias.

A figura 5 apresenta a evolução da degradação do nitrovin nas amostras de cama nos 4 períodos de compostagem. Pode-se observar que no T4 houve uma diferença significativa entre os períodos 0 e 120 dias e entre os períodos 0 e 180 dias de compostagem. No T2 pode se observar uma diferença significativa entre os períodos 0 e 60 dias; e 0 e 180 dias, porém não existe diferença significativa entre os períodos 0 e 120 e 60, 120 e 180 dias.

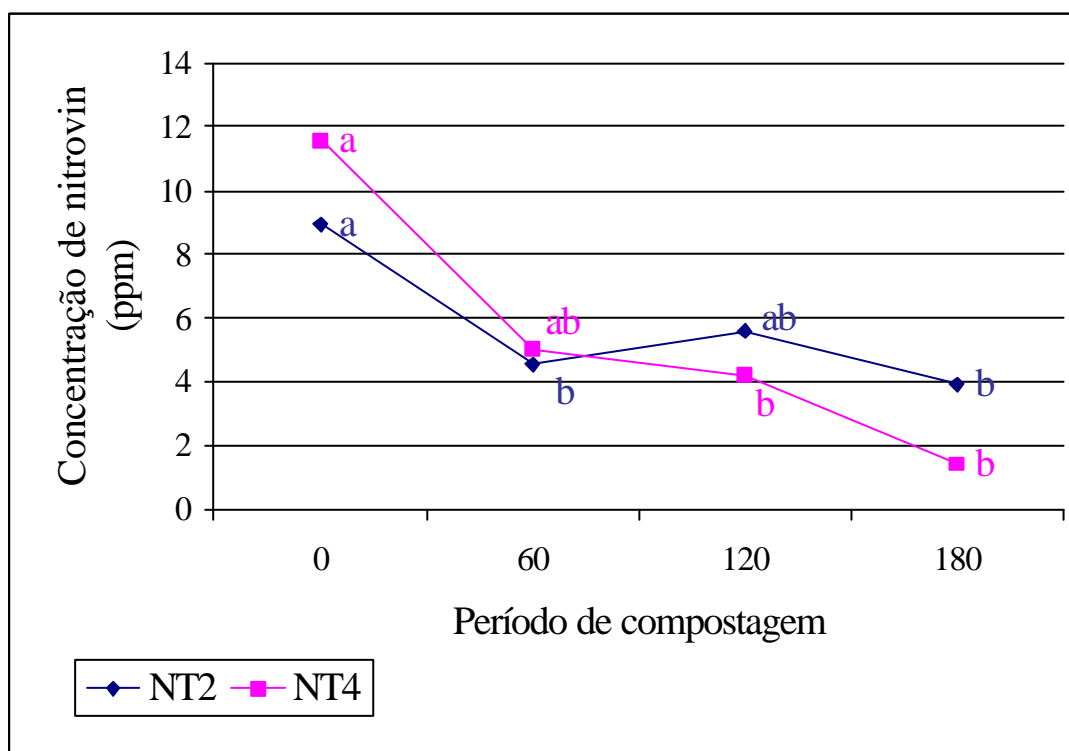
No T2, esperava-se que a concentração de nitrovin encontrada no período de 120 dias de compostagem fosse inferior a do período 60 dias, porém isso não foi constatado. A natureza heterogênea das amostras, bem como, as características do composto podem ter contribuído para um aumento da variabilidade destes resultados. A cama de aviário é um material constituído de diferentes componentes (maravalha, pena, ração, fezes, urina, água, entre outros). Embora tenhamos tomado o devido cuidado para padronizar a coleta, é certo que a natureza desta matriz contribuiu para aumentar a variabilidade das análises. O processo de compostagem para ser eficaz, depende principalmente de níveis adequados de umidade, de pH e de microorganismos presentes no material em fermentação. Na cama de aviário o teor de

umidade está relacionado principalmente, com a água que cai dos bebedouros e com a urina excretada pelas aves. O nível de pH depende principalmente, da concentração de amônia proveniente da urina. É possível que a cama que utilizamos (1º lote) tenha apresentado níveis insuficientes desses parâmetros em algumas amostras e que isto tenha interferido também na variabilidade das análises.

Tabela - 10 - Médias (\pm desvio padrão) das concentrações de nitrovin nas amostras de cama dos tratamentos 2 (40 ppm) e 4 (80 ppm) nos quatro períodos de compostagem.

Tratamento	Período de compostagem (dias)			
	0	60	120	180
2	8,9 ^a \pm 4,2	4,5 ^a \pm 3,4	5,6 ^a \pm 2,6	3,9 ^a \pm 1,9
4	11,6 ^a \pm 5,0	4,2 ^a \pm 5,9	4,3 ^a \pm 5,9	1,4 ^b \pm 1,5

Médias com letras iguais no sentido da coluna não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de TUKEY.



Médias com letras iguais no sentido da linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de TUKEY.

Figura 5 – Evolução da degradação do nitrovin nas amostras de cama de aviário nos quatro períodos de compostagem para o tratamento 2 (40 ppm) e para o tratamento 4 (80 ppm).

4.2.3. CONCENTRAÇÃO DE OLAQUINDOX NA CAMA DE AVIÁRIO

Nas condições experimentais validadas, foram analisadas as amostras de cama de aviário dos tratamentos 3 e 5, cujas aves foram alimentadas com ração aditivada com 40 e 80 ppm de olaquinox, respectivamente. Em todas as amostras analisadas não foram encontradas quantidades detectáveis de olaquinox. Esses resultados podem estar relacionados com as propriedades fotossensíveis e com o tempo de meia vida desta substância. O tempo de meia-vida do olaquinox no solo varia de 3 a 8 dias (INGERSLEV, 2001) e sob a presença de luz o olaquinox é altamente instável (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1985 & CERREZO et al. , 1991). Como o experimento zootécnico foi todo desenvolvido na presença de luz (natural e artificial), é convincente a idéia de que essa condição tenha contribuído para a degradação rápida dessa substância.

5. CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento se pode concluir que:

- A utilização ou não de promotores de crescimento não interferiu no peso vivo, ganho de peso, no consumo de ração, no rendimento de carcaça, cortes e de vísceras, no fator de produção e no percentual de mortalidade de frangos de corte, entre 0 – 48 dias de idade;
- As aves que receberam probióticos nas rações, não apresentaram diferenças significativas para a conversão alimentar, em relação as que não receberam promotores de crescimento. Entretanto, se comparadas as que receberam antimicrobianos observou-se uma piora na conversão alimentar, refletindo-se no custo de produção.
- Os dois antimicrobianos (nitrovin e olaquinox) utilizados como promotores de crescimento nas rações, apresentaram degradação diferenciada durante o processo de compostagem (uma lenta e a outra muito rápida). Esta diferença indica a necessidade de prudência quanto ao uso da cama de aviário.
- Quando forem utilizados na ração, promotores de crescimento de lenta degradação, como o nitrovin, a cama de aviário deverá sofrer um processo de compostagem para ser viabilizada como adubo orgânico.
- A técnica de CLAE utilizada e as metodologias adaptadas apresentaram uma execução relativamente simples, foram suficientemente sensíveis, específicas e reprodutíveis.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os níveis de pH, os teores de umidade e a diversidade e quantidade de microorganismos presentes em uma cama de primeiro lote poderão ser diferentes de uma cama de mais de um lote. Sendo assim, é conveniente dizer que, uma substância antimicrobiana presente em uma cama de primeiro lote, poderá levar um período maior para ser degradada do que se estivesse em uma cama de mais de um lote.

Nesse experimento, o uso da cama de primeiro lote, representou uma medida profilática para evitar problemas de contaminação ambiental e de higiene. Essa medida aliada aos cuidados de manejo e o ótimo estado sanitário das aves contribuíram para evitar os “distúrbios” de saúde dos animais. Os promotores de crescimento são usados para evitar esses distúrbios. Neste experimento não se observou a ocorrência de “distúrbios” e também não se obteve diferenças significativas ($p > 0,05$) para a maioria dos parâmetros avaliados. Com base nisto, pode-se supor que os promotores de crescimento talvez necessitem de “um meio mais adequado” para expressar eficazmente seu potencial.

Os resultados obtidos neste experimento apontam a necessidade de estudos sobre o tipo de cama de aviário que o produtor de frango está utilizando atualmente como, por exemplo, até quantos lotes a cama é usada, para se estabelecer nos experimentos subsequentes avaliações mais próximas às condições do produtor. Neste caso, talvez possamos obter diferenças mais significativas entre os promotores de crescimento utilizados. Em novos experimentos seria importante medir as características de pH, de umidade e de temperatura durante toda a compostagem da cama para avaliar melhor o efeito desses parâmetros dentro do processo de degradação das substâncias antimicrobianas; além de desenvolver trabalhos para avaliar a resistência microbiológica às substâncias antimicrobianas promotoras de crescimento.

Embora não tenhamos detectado a presença de olaquinox na cama de aviário não significa que essa matriz esteja livre de qualquer substância que possa apresentar riscos ao ambiente. O processo de biodegradação, numa matriz complexa como a que examinamos, não só a presença de promotores de crescimento deve ser motivo de preocupação. Juntam-se a ela, certamente, resíduos de fungicidas, herbicidas, etc., que foram incorporados as matérias primas durante a fase de cultivo e armazenagem. Além disso outros aditivos que são colocados na ração durante seu preparo deveriam ser melhor estudados. Naturalmente, por

questões técnicas nos limitamos a estudar os promotores de crescimento nitrovin e olaquinox.

7. BIBLIOGRAFIA

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. **Determination of Nitrovin in Medicated Animal Feeds by High-performance Liquid Chromatography**. Analyst, v. 116, p. 415 - 420, abril de 1991.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. **Determination of Olaquinox in Medicated Animal Feeds by High-performance Liquid Chromatography**. Analyst, v. 110, p. 75 - 77, janeiro de 1985.

ANDREATTI, R. L. & SAMPAIO, H. M. **Probióticos e Prebióticos**. Educação continuada. São Paulo, v. 02, fascículo 03, p. 059-071, 2000.

ATHERTON, D. & ROBBINS, S. **Probiotics – a European perspective**. In: JYONS, T. P. (ed.) *Biotechnology in the feed industry*. Nicholasville: Alltec Technical, p. 166-167, 1987.

BERTECHINI, A. G. & HOSSAIN, S. M. **Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frango de corte**. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. **Anais**. Santos, 1993.

BIANCOTTO, G.; ANGELETTI, R. & PICO, R. D. M. **Detection of veterinary drugs in foodstuffs using Gel Permeation**. Analyst, v. 121, p. 229 – 232, fevereiro de 1996.

BUTOLO, J. E. **Utilização de ingredientes líquidos na alimentação animal**. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Anais**. Campinas: CBNA, p. 295-334, 2001.

CASEWELL, M. W. **Antimicrobial Resistance in Humans and Animal Feed Additives in Perspective**. FEDESA/FEFANA, p. 6-8, 1998.

CEREZO, J. L. G. & SANTOS, A. J. **Avilamicina: la sustancia activa de un nuevo promotor de las producciones animales**. Separata de Medicina Veterinaria. Barcelona, vol. 8, n. 5, p. 1-8, 1991.

D'ÁVILA, Z. S. **A vez do frango brasileiro**. Anuário' 2002 da avicultura industrial, p. 34, 2002.

DEMOTES-MAINAIRD, F. M.; VINÇON, G. A.; JARRY, C. H. & ALBIN, H. C. **Micro-method for the determination of roxithromycin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection**. *Jornal Chromatography Biomedical Application*, v. 490, p. 115-123, 1989.

EL BOUSHY, A. R. Y & VAN DER POEL, A. F. B. **Poultry feed from waste: processing and use**. London, UK, Chapman & Hall, 1^a ed., p. 438, 1994.

FEFANA, **Antimicrobials as Feed Additives**, junho, 1997.

FERNANDES, P. C. C. **Lactobacillus sp. Na alimentação de bezerros pré-ruminantes**. In: **CADERNO TÉCNICO DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**, Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, p. 5, 1995.

FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos probióticos: uma realidade**. In: **LEITE DE DERIVADOS**, v. 42, p.66-70, 1998.

FOX, S.M. **Probiotics: Intestinal inoculants for production animals**. *Veterinary Medicine*, v. 83, n. 8, p. 806-829, 1988.

FULLER, R. & GIBSON, G.R. **Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics**. *Scandinavy Journal Gastroentorology*, v. 32, p. 28-31, 1995.

FULLER, R. **Probiotic in man and animals – a review**. *Journal Applied Bacteriology*, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. **Probiotics the Scientific Basis**. 1 ed. London. In: **CHAPMAN HALL**. **Probiotics for chickens**, p. 398, 1992.

GEDEK, B. **Probiotics in animal feeding - effects on performance and animal health -**. Feed Management, v. 3, p. 21-24, 1986.

GIBSON, G. R. & ROBERFROID, M. B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics**. Journal of Nutrition, v. 125, p. 1401-1412, 1996.

GLIDDON, M. J.; CORDON, C. & PARNHAM, G. M. **Determination of Nitrovin in Animal Feedingstuffs by High-performance Liquid Chromatography**. Analyst, v. 108, p. 116 - 119, janeiro de 1983.

GONZALES, E.; MENDES, A. A. & LODDI, M. M. **Efeito da adição de probiótico e antibiótico como promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte**. In: XXXV Reuniao Anual Da SBZ, 1998, Botucatu. **Anais**. Botucatu: SBZ, p. 189-191, 1998a.

GONZALES, E.; MENDES, A. A. & TAKITA, T. S. **Adição de probiótico e antibiótico como promotor de crescimento para frangos de corte, características de carcaça**. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais**. Campinas: APINCO, p. 27, 1998b.

GUSILS, C.; CHAIA, A. P.; GONZÁLEZ, S. & OLIVER, G. **Lactobacillus isolated from chicken intestines: potencial use as probiotics**. Journal Food Protection, v. 62, p.252- 256, 1999.

HENRIQUE, A. P.; FARIA, D. & NETO, R. F. **Uso de probióticos e antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte**. . In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, São Paulo, 1997. **Anais**. São Paulo: APINCO, p. 28, 1997.

HENRIQUE, A. P.; FARIA, D. & FRANZOLIN, R. **Uso de probióticos e antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte**. In: XXXV Reunião Anual da SBZ, Botucatu, 1998. **Anais**. Botucatu: SBZ, p. 297-299, 1998.

INGERSLE, V F & HALLING, S B. **Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries.** Ecotoxicology and environmental safety, v. 48, n. 3, p. 311 - 320, março de 2001.

JIN, L.Z., HO, T.W., ABDULLAH, N. & JALALUDIN, S. **Probiotics in poultry: modes of action.** World's Poultry Science Journal, v. 53, p. 351-368, 1997.

JONES, C. D. & THOMAS, C. N. **The maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing stable bacteria.** In: LYONS, T. P. (ed.) Biotechnology in the feed industry. Nicholasville: Alltech Technical Publication, p. 157-166, 1987.

KLANHEAMMER, T. R. **Microbiological considerations in selection and preparation Lactobacillus strain for use as dietary adjuncts.** Journal Dairy Science, v. 65, n. 7, p. 1339-1349, 1982.

KLIN S. **Virginiamycin.** Technical Manual, p. 1-10, 1991.

KOSTER, L. M. **Nitrovin – el estimulante sintético del crecimiento –** Orphahell BV. Centro de Publicaciones y documentación Agrícola, p.5-7, 1973.

KUSSAKAWA, K. C. K. & FERREIRA, A. B. **Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte.** Manual técnico. Biotecnal, 1999.

LAU, C. E.; DOLAN, S. & TANG, M. **Microsample determination of diazepam and its three metabolites in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography.** Journal Chromatography Biomedical Application, v. 416, p. 212-218, 1987.

LEME, R. P.; ALLEONI, F. G. & CAVAGUTI, E. **Utilização da cama de frango – composição e valor nutritivo –** Simpósio sobre resíduos da produção avícola. EMBRAPA, p. 44-45, 2000.

LEVY, S. B. **Antibiotic Use for Growth Promotion in Animals: Ecology and Public Health Consequences.** Journal of Food Protection, v. 50, n. 7, p. 616-620, 1987.

LEVY, S. B. **Antibiotics resistance**. Tufts University Scientific American, março, 1998.

LILLY, D. M. & STILLWEL, R.H. **Probiotics grow promoting factors produced by microorganisms**. Science, v. 147, p. 747-748, 1965.

LODDI, M. M. **Probióticos e prebióticos na nutrição de aves**. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, n. 23, maio/junho/julho/agosto de 2001.

MACHADO, J. S. **Consumo per capita de frango**. ICEPA, 2002a. Disponível em: <<http://www.icepa.com.br>>. Acesso em: 01/2002.

MACHADO, J. S. **Produção de carnes: abate mensais de aves, suínos e bovinos – 2000 e 2001**. ICEPA, 2002b. Disponível em: <<http://www.icepa.com.br>>. Acesso em: 01/2002.

METCHNIKOFF, E. **Prolong of life**. New York, Putnam, 1907.

MONTES, A. J. & PUGH, D. G. **The use of probiotics in the food-animals practice**. Veterinary Medicine, v. 88, n. 3, p. 282-288, 1993.

MOTA, E. G. **Restrição e uso de Aditivos (promotores de crescimento) em rações de aves**. In: Conferência APINCO 1996 de Ciência e Tecnologia Avícolas. **Anais**, p. 57, 1996.

NOUSIAINEN, J. & SETÄLÄ, J. **Lactic acid bacteria as animal probiotics**. In: SALMINEN, S.& VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**. New York, p. 315-356, 1993.

NURMI, E. & RANTALA, M. **New aspects of Salmonella infection in broiler production** Nature, v. 241, p. 210-211, 1973.

PARKER, J.; BROCK, T. D.; MADIGAN, T. M.& MARTINHO, J. M. In: **Biology of microorganisms**, pg 430, 1994.

PARKER, R. B. **Probiotics, the other half of the antibiotic story**. Animal Nutrition Health, v. 29, p. 4-8, 1974.

PORTER, P. & BARRAT, M. E. I., 1987. In: HERENSIGN, W.& COLE, D. J. A. **Recent advances in animal nutrition**, London: Butterwoth, p. 107-116, 1987.

PUROBCAN, R.S. **Probiotics in the 1990s**. Education Practic Veterinary, v. 12, n. 9, p. 1353-1359, 1990.

RANG, H.P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. **Agentes antibacterianos**. In: Farmacologia. Rio de Janeiro, 4^a ed., Guanabara Koogan, p. 576-593, 2001.

SALMINEN, S.; RAMOS, P. & FONDEN, R. **Substrates and lactic acid bacteria**. In: SALMINEN, S. & VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**, New York, p. 295-306, 1993.

SILVA, E. N., **Probióticos e Prebióticos na Alimentação de aves**. Conferência APINCO'2000 de ciência e tecnologia, p. 242, 2000.

SIMON, G. L. & GORBBACH, S. L. **Intestinal flora in health and disease**. Gastroenterology, n. 86, p. 174-193, 1984.

SINIGOJ G. K & DOGANOC D. Z. **Detection of olaquinox in porcine muscle tissue with HPLC and UV protection [detection]**. Veterinarske Zbornik Fakultete Univerza Ljubljana. Ecotoxicology and environmental safety, v. 34, n. 1, p. 13-18; 1997.

SISSONS, J. W. **Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals – a review**. Journal of Science Food Agricultural, v. 49, n. 1, p.1-13, 1989.

SOUZA, E. C. **Uma guerra quase perdida**. Ciência Hoje, p. 27-35, maio, 1998.

STEWART, C. S. & CHESSON, A. **Making sense of probiotics**. Pig Veterinary Journal, v. 31, p. 11-33, 1993.

STROMBECK, D. R. & GUILFORD, W. G. **Small animal gastroenterology**, 2^a ed. London: Wolfe Publ., p. 744, 1991.

SYSTAT FOR WINDOWS. Statisc Version 5.04. Evanton, Illinois, 1994.

TALAMINI, D. **A avicultura em 2001**. Anuário' 2002 da avicultura industrial, p. 14. 2002.

VANBELLE, M.; TELLER, E. & FOCANT, M. **Probiotics in animal nutrition: a review**. Animal Nutrition, Berlim, v. 40, n. 7, p. 543-567, 1990.

YAZAWA, K.& TAMURA, Z. **Search for sugar sources for selective increase of bifidobacteria**. Bifidobacterial Microflora, v. 1, p. 39-44, 1982.

ZIGGERS, D.& SLUIS, W. **Study affirms microbe resistance**. World Poultry – Elvier, v. 14, n. 9, 1998.

ANEXO 2 – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO POR BAIA E TRATAMENTO.

BAIA:

TRATAMENTO:

DIA	DATA	Nº MORTOS	PESO TOTAL MORTOS	RAÇÃO (KG)	DIA	DATA	Nº MORTOS	PESO TOTAL MORTOS	RAÇÃO (KG)
1					22				
2					23				
3					24				
4					25				
5					26				
6					27				
7					28				
8					29				
9					30				
10					31				
11					32				
12					33				
13					34				
14					35				
15					36				
16					37				
17					38				
18					39				
19					40				
20					41				
21					42				
OBSERVAÇÕES					43				
					44				
					45				
					46				
					47				
					48				
					49				
					50				

Anexo 3 - Concentrações de Nitrovin (ppm) nas amostras de cama de frango dos tratamentos 2 (40 pmm) e 4 (80 ppm) para os quatro períodos de compostagem.

Tratamento/Amostra	Período de compostagem			
	0	60	120	180
T2/B3	13,46	3,28	9,20	7,12
T2/B17	11,06	7,07	6,91	5,29
T2/B28	11,62	10,42	7,42	5,34
T2/B38	13,25	2,46	4,12	2,57
T2/B48	4,19	1,18	2,83	1,68
T2/B56	8,35	7,58	7,52	4,01
T2/B69	2,18	2,77	1,88	2,42
T2/B76	7,39	1,62	4,86	2,94
Média	8,94	4,55	5,59	3,92
DP	4,20	3,40	2,60	1,90
T4/B8	15,37	13,77	12,27	4,36
T4/B16	22,14	13,62	15,09	1,77
T4/B26	9,87	1,35	1,47	1,66
T4/B34	5,04	NQ	NQ.	NQ.
T4/B45	12,83	NQ	1,14	NQ.
T4/B59	11,07	4,71	NQ	NQ.
T4/B66	10,14	6,81	1,44	1,27
T4/B73	6,27	NQ	2,29	2,48
Média	11,59	5,04	4,21	1,44
DP	5,04	5,90	5,90	1,51

NQ = Não quantificável. Para cálculo de média NQ foi considerado como “zero”. B = Baia